

Aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie der  
Philipps-Universität Marburg.

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Moll

Abteilung für Neuropathologie, Leiter: Prof. Dr. H. D. Mennel

**Die Bedeutung des Fehlpaarungs-Reparatur-Systems und des TP53  
Status als prädiktive Faktoren der primären Chemoresistenz in  
humanen Glioblastomen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt  
von Philipp Rellecke aus Meschede

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität  
Marburg am 10. Oktober 2002.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. H. D. Mennel

**Für meine lieben Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Problemstellung	6
1.2 Glioblastoma multiforme	7
1.2.1 Klassifikation und Pathologie von glialen Tumoren	7
1.2.2 Epidemiologie	9
1.2.3 Ätiologie und Risikofaktoren	11
1.2.4 Pathogenese und molekulare Pathologie	14
1.2.5 Therapeutische Strategien und Prognose	19
1.2.6 Chemotherapie beim Glioblastoma multiforme	21
1.2.7 Chemoresistenz	25
1.2.8 Chemosensitivitäts-Testung <i>in vitro</i>	27
1.3 Fehlpaarungs-( <i>Mismatch</i> )-Reparatur-System	28
1.3.1 Nomenklatur und Bestandteile	28
1.3.2 Mechanismus und Funktion	30
1.3.3 Mismatch-Reparatur in Tumorigenese und Chemoresistenz	32
1.4 <i>TP53</i> in malignen Gliomen	37
2. Zielsetzung der Arbeit	40
3. Material und Methoden	41
3.1 Material	41
3.1.1 Chemikalien und Geräte	41
3.1.2 Puffer und Lösungen	42
3.1.3 Oligonukleotide	42
3.1.4 Antikörper	44
3.1.5 Glioblastome	44
3.2 Methoden	44
3.2.1 Tumorzell-Kultivierung	44
3.2.2 Chemosensitivitäts-Testung	45
3.2.3 Extraktion der Nukleinsäuren	46
3.2.3.1 Extraktion der RNA	46
3.2.3.2 Extraktion der genomischen DNA	47
3.2.4 Extraktion der Proteine	47
3.2.5 RT-PCR	48
3.2.5.1 Synthese der komplementären DNA	48

3.2.5.2	Polymerase Kettenreaktion	48
3.2.6	Western Blot Analyse	49
3.2.6.1	Bradford Assay	49
3.2.6.2	SDS-PAGE	49
3.2.6.3	Western Blot	49
3.2.7	Immunhistochemie	50
3.2.8	<i>TP53</i> Mutationsanalyse	51
3.2.8.1	PCR Amplifikation	51
3.2.8.2	Denaturierende Hoch-Druck-Flüssigkeits-Chromatographie	51
4.	Ergebnisse	53
4.1	Chemosensitivitäts-Testung	53
4.2	RT-PCR	55
4.3	hMSH2 Western Blot	61
4.4	hMSH2 Immunhistochemie	62
4.5	<i>TP53</i> Status	64
4.5.1	<i>TP53</i> Western Blot	64
4.5.2	<i>TP53</i> Mutationsanalyse	65
5.	Diskussion	67
5.1	Zielsetzung und Ergebnisse	67
5.2	Chemosensitivitäts-Testung	68
5.3	Mismatch-Reparatur (MMR) Gen-Expression	75
5.4	<i>TP53</i> Status	81
5.5	Zusammenfassende Diskussion und Schlußfolgerungen	84
6.	Zusammenfassung	88
7.	Literaturverzeichnis	90

## 1. Einleitung

### 1.1 Problemstellung

Das Glioblastoma multiforme macht etwa 50-60% aller astrozytären Tumoren und etwa 40% aller glialen Tumoren aus (Kuratsu et al. 1996/1997, Preston-Martin et al. 1993). Damit ist dieser maligne gliale Tumor der häufigste primäre Tumor des ZNS und ist für 12-15% aller intrakraniellen Tumorerkrankungen verantwortlich (Zülch 1980). Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung beträgt weniger als ein Jahr und weniger als 2% aller Patienten überleben trotz aggressiver Therapie länger als 3 Jahre (Scott et al. 1998). Aufgrund des extrem infiltrativen Wachstumsverhaltens des Tumors sind lokal wirksame Therapiemodalitäten, wie die chirurgische Resektion und die Bestrahlung, wenig in der Lage ein Langzeitüberleben dieser hochmalignen Erkrankung zu ermöglichen, da beide Verfahren nicht alle Tumorzellen erfassen. Auch bei der systemischen Chemotherapie gibt es bisher keinen durchschnittlichen Überlebenszeitgewinn, aber man findet nach adjuvanter Chemotherapie etwa 15% Langzeitüberlebende im Vergleich zu weniger als 5% nur nach chirurgischer Resektion und Radiatio (Hofer und Herrmann 2001). Ein Hauptgrund für die nur enttäuschende Wirkung ist die ausgeprägte Chemoresistenz eines Großteils dieser Tumoren (Prados und Levin 2000). Eine Untergruppe von Patienten scheint allerdings von der Chemotherapie zu profitieren. Ziel weiterer wissenschaftlicher Arbeit muss daher sein, prädiktive Faktoren, möglicherweise in Form von molekularen Resistenzmechanismen, zu identifizieren, die ein sinnvolles Einsetzen der belastenden Chemotherapie möglich machen. Aber nicht nur für die Prädiktion ist es bedeutend Mechanismen der Chemoresistenz zu verstehen, auch für die Entwicklung effektiver Strategien gegen diese hochmalignen Tumoren, ist das Wissen um die Biologie der Chemoresistenz außerordentlich wichtig.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung von DNA-Reparatur- und Apoptose-Mechanismen für die Chemoresistenz in Glioblastomen. Daraus ableitend soll die Bedeutung dieser Faktoren für eine mögliche Prädiktion der Chemosensitivität erarbeitet werden.

## 1.2 Glioblastoma multiforme

### 1.2.1 Pathologie und Klassifikation von glialen Tumoren

Gliome sind pathologisch definiert als Tumoren, die histologische, immunhistochemische und ultrastrukturelle Zeichen einer glialen Differenzierung aufweisen. Die heutige Klassifikation und Graduierung folgt den Richtlinien der *World Health Organization, WHO* (Kleihues and Cavenee 2000).

Gliome werden klassifiziert entsprechend ihrer angenommenen Ursprungsgewebe bzw. -zellen, d.h. sie zeigen Charakteristika von astroglialen, oligodendroglialen oder ependymalen Gliazellen. Ein überzeugender Beweis dafür, dass diese Zellen auch der Ursprung der entsprechend klassifizierten Tumoren ist, steht bis heute allerdings aus (Collins 1998).

Die Tumoren werden außerdem entsprechend ihrer Malignität auf einer 4-stufigen Skala, entsprechend den WHO-Graden I-IV, durch histopathologische Kriterien, auf die weiter unten genauer eingegangen wird, graduiert.

Im Gegensatz zu einer Vielzahl von soliden Tumoren metastasieren Gliome praktisch nie hämatogen in andere Organe (Hoffman et al. 1985) und nur außerordentlich selten innerhalb der Liquorräume (Giordana et al. 1995), so dass die histopathologische Graduierung die primäre Determinante für die klinische Prognose ist. WHO-Grad I Tumoren sind biologisch benigne und können, falls dies möglich ist, durch vollständige neurochirurgische Resektion geheilt werden. WHO-Grad II Tumoren sind niedriggradige Malignome und können einen günstigen klinischen Verlauf aufweisen, eine Heilung durch Resektion ist hierbei allerdings nicht die Regel. Gliome, die dem WHO-Grad III entsprechen, sind maligne Tumoren und führen innerhalb weniger Jahre zum Tod der Patienten, WHO-Grad IV Gliome sind hochmaligne und letal zumeist innerhalb von 9-12 Monaten. Etwa 70% der WHO-Grad II Tumoren transformieren sich innerhalb von 5-10 Jahren zu den höhergradigen Gliomen vom WHO-Grad III-IV und verhalten sich klinisch dann entsprechend.

Das Glioblastome multiforme wurde bereits in der 2. Auflage der WHO-Klassifikation von Tumoren des Nervensystems der Gruppe der astrozytären Tumoren zugeordnet (Kleihues et al. 1993). Einige Autoren gehen zwar davon aus, dass auch anaplastische Oligodendrogliome und sogar Ependymome durch Tumorprogression die histopathologischen Kriterien zur Diagnose eines Glioblastoms erfüllen können, man findet bei diesen Tumoren allerdings gewöhnlich astrogliale Differenzierungen, so dass die Einteilung in die Gruppe der astrozytären Tumore gerechtfertigt erscheint. Weitere Unterstützung dafür erhielt man durch molekulargenetische Untersuchungen. Diese konnten zeigen, dass sowohl niedriggradige Astrozytome, anaplastische Astrozytome und Glioblastome insgesamt in ca. 20-30% *TP53* Mutationen aufweisen, dagegen die nicht-astroglialen Neoplasien nur sehr selten *TP53* Veränderungen zeigen (Ohgaki et al. 1991). Detailliertere Ausführungen dazu folgen im Abschnitt Pathogenese und molekulare Pathologie.

Die astrozytären Tumore werden in der WHO-Klassifikation in die Gruppe der umschriebenen Astrozytome und die Gruppe der diffusen Astrozytome unterteilt.

In die erste Gruppe gehören das pilozytische Astrozytom (WHO-Grad I), das pleomorphe Xanthoastrozytom und das subependymale Riesenzell-Astrozytom (WHO-Grad I) bei der Tuberösen Sklerose. Diese Tumoren wachsen umschrieben, zeigen praktisch keine Progression und sind klinisch somit als gutartig zu bezeichnen. An dieser Stelle muß allerdings angemerkt werden, dass auch diese Tumoren, wenn sie an strategisch ungünstiger Position liegen, für die betroffenen Patienten prognostisch sehr ungünstig sein können.

In die Gruppe der diffusen Tumoren gehören das Astrozytom (WHO-Grad II) mit den Subtypen fibrilläres, protoplasmatisches und gemistozytisches Astrozytom, das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) und das Glioblastom (WHO-Grad IV). Diese Gliome wachsen diffus infiltrierend, was eine chirurgische Resektion schwierig bis unmöglich macht, und zeigen eine Tumorprogression von WHO-Grad II zu WHO-Grad III und WHO-Grad IV Tumoren. Sie zeichnen sich so in der Regel durch einen klinisch malignen Verlauf aus.



Die WHO-Graduierung basiert auf der Präsenz histopathologischer Charakteristika der Malignität wie hohe Zellularität, zelluläre Pleomorphie, hohe mitotische Aktivität, mikrovaskuläre Proliferationen und Nekrosen. WHO-Grad II Tumoren weisen zelluläre Pleomorphie auf, sonst aber keines der eben genannten histopathologischen Charakteristika. Das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) zeigt außerdem eine hohe mitotische Aktivität, das Glioblastom (WHO-Grad IV) zusätzlich mikrovaskuläre Proliferationen und /oder Nekrosen.

Für klinische Studien werden die Astrozytome außerdem in die niedriggradigen, vor allem WHO-Grad II, und die höhergradigen Tumore, anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III) und Glioblastome (WHO-Grad IV), unterschieden.

### 1.2.2 Epidemiologie

Größeren epidemiologischen Studien zufolge beträgt die jährliche Inzidenz für primäre Hirntumoren in den Industrieländern zwischen 7,2 und 14,3 bzw. durchschnittlich 10,2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Kuratsu et al. 1996, Kuratsu et al. 1997, Preston-Martin et al. 1993, Radhakrishnan et al. 1995, Walker et al. 1985). Bis zum Alter von 65 Jahren findet man einen steten Anstieg der Inzidenzrate, danach fällt sie wieder leicht ab (Preston-Martin et al. 1993). Zu diesen primären Hirneoplasmen kommen nun, mit einer fast gleich hohen jährlichen Inzidenz von durchschnittlich 8,2 pro 100.000 Einwohnern, die sekundären Hirngeschwülste wie Metastasen (Walker et al. 1985). Mit einem Anteil von etwa 1-2% aller neu diagnostizierten Tumorerkrankungen überhaupt gehören die primären Hirntumoren sicherlich zu den eher seltenen Neoplasien (Prados und Levin 2000), sie machen allerdings immerhin 3-5% aller Krebstodesfälle aus (Fine et al. 1994, Preston-Martin et al. 1993), was schon auf die Problematik der teilweise außerordentlich schwierigen Therapie und damit häufig schlechten Prognose hinweist. Obwohl in Deutschland ein zentrales Krebsregister zur epidemiologischen Datenerfassung fehlt, muss man auch hier von ähnlich hohen Zahlen ausgehen (Davis et al. 1991). So rechnet man in Deutschland

mit bis zu 8000 Neuerkrankungen pro Jahr an primären Hirntumoren und zusätzlich mit etwa in der gleichen Größenordnung liegenden sekundären Hirngeschwulsten. Die Mortalitätsrate für die primären Hirntumoren beträgt in Deutschland etwa 5200 Todesfälle pro Jahr, für metastatische ZNS-Neoplasien ist dies ungleich schwieriger zu berechnen, da die Todesursache bei metastasierten Malignomerkrankungen oft nicht valide genug abgrenzbar ist. Die geschätzte Zahl der ausschließlich an zerebralen Metastasen Verstorbenen liegt bei 3000 Todesfällen pro Jahr (Steiner et al. 1998).

1998 lag die erwartete Zahl von Neuerkrankungen an Tumorerkrankungen des ZNS in den USA bei 17.400, wovon 9.800 Patienten männlich und 7.600 Patienten weiblich waren. Die Zahl der hierdurch erwarteten Todesfälle lag bei 13.300 im Jahre 1998 (Landis et al. 1999).

Die Tumoren des Neuroepithels, hier vor allem die Gliome, machen mit etwa 60% den größten Teil aller Hirntumoren aus, wobei der Anteil maligner Gliome besonders hoch ist; das Glioblastoma multiforme beispielsweise macht etwa ein Drittel dieser Tumoren aus (Kuratsu et al. 1996/1997, Preston-Martin et al. 1993). Andere neuroepitheliale Tumoren, wie die Medulloblastome und die Ependymome zählen mit jeweils 1-2% aller Hirntumoren zu den nicht so häufigen Entitäten (Steiner et al. 1998). Tumoren der Hypophyse, hier vor allem die Hypophysenadenome, machen etwa 10% aller intrakraniellen Tumoren aus (Kuratsu et al. 1996/1997). Primäre zentralnervöse Lymphome, die besonders bei an AIDS erkrankten Patienten zu finden sind, haben in letzter Zeit stark zugenommen, so dass für die nächsten Jahre mit bis zu 2,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern jährlich gerechnet werden muss. Dadurch wird diese Entität auch immerhin etwa 10% aller Hirntumore ausmachen (Corn et al. 1997). Neben den primären Lymphomen nehmen bei Menschen über 65 Jahre aber auch die malignen Gliome deutlich zu, und zwar unabhängig von der allgemeinen Zunahme maligner Erkrankungen insgesamt und unabhängig von verbesserten diagnostischen Möglichkeiten (Werner et al. 1995)

Insgesamt ist das Glioblastoma multiforme der häufigste Hirntumor und macht 12-15% aller intrakraniellen Neoplasien und 50-60% aller astroglialen Neoplasien aus (Zülch 1980). In den meisten europäischen und nordamerikanischen Ländern liegt die jährliche Inzidenz bei etwa 2-3

Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Lantos et al. 1996). Glioblastome können grundsätzlich in jedem Alter auftreten, 70% der Erkrankungen treten allerdings im Alter zwischen 45 und 70 Jahren auf. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 53 Jahren, Männer sind etwa 1,5 mal häufiger betroffen als Frauen (Zülch 1980). Zwischen 8% und 9% der Fälle treten im Kindesalter auf (Dohrman et al. 1976), angeborene Glioblastome sind allerdings selten (Buetow et al. 1990), obwohl auch über Fälle in der 29. Schwangerschaftswoche berichtet wurde (Doren et al. 1997).

### 1.2.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ursache und die Ätiologie eines Glioblastoma multiforme sind ähnlich wie bei anderen Hirntumoren sowie bei einem großen Teil aller menschlichen Tumoren weitgehend unbekannt (Hochberg et al. 1984). Man geht heute allerdings davon aus, dass maligne Tumoren durch eine sukzessive Akkumulation von Veränderungen der genomischen DNA, bedingt durch verschiedene Noxen aus der Umwelt auf der Basis einer genetischen Disposition, entstehen.

Eine Vielzahl von Faktoren, die statistisch signifikant häufiger mit Tumoren des ZNS einhergehen, sogenannte Risikofaktoren, sind über mehrere Jahrzehnte erarbeitet und z.T. sehr kontrovers diskutiert worden. An dieser Stelle soll deshalb nur die aktuelle Datenlage zusammenfassend dargestellt werden.

Ein erhöhtes Risiko haben Menschen, die sehr proteinreiche Nahrung zuführen, was am ehesten auf die damit assoziierte Aufnahme von Nitrosaminen zurückzuführen ist, die ebenfalls einen Risikofaktor darstellen (Kaplan et al. 1997). Vor allem genetisch suszeptible Menschen scheinen hier besonders betroffen zu sein, so konnte ein Trend für ein erhöhtes Risiko für Gliome bei Individuen mit einem schnellen NAT2 Azetylierungssystem festgestellt werden (Trizna et al. 1998). Im Gegensatz dazu scheint die Aufnahme sowohl von Kochsalz als auch von Fett und Cholesterol eher invers mit dem Gliom-Risiko korreliert zu sein (Kaplan et al. 1997). Eine Arbeit konnte zeigen, dass der vermehrte Konsum von gebratenen Speisen,

von Zigaretten, vor allem Zigaretten ohne Filter, und von Alkohol-haltigen Getränken ebenfalls mit einem höheren Risiko für Gliome einhergeht, die Zufuhr von Vitamin C allerdings eher protektiv ist (Lee et al. 1997). Protektiv wirkt ebenfalls die Zufuhr von Gemüse und Früchten (Hu et al. 1998). Dies alles weist ebenfalls auf die Bedeutung von Nitrosaminen, aber auch von anderen Oxidantien, im Hinblick auf die Tumorigenese von glialen Tumoren hin. Andere Autoren sehen allerdings keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Alkohol- und Nikotinkonsum und Hirntumoren (Hurley et al. 1996).

Mutagene Umweltgifte wie Organochlorverbindungen, die in Oberflächen-gewässern zu finden sind, z.B. Trichlormethan als Nebenprodukt der Chlorierung von Trinkwasser, stellen genauso wie die Nitrosamine ein Risiko für die Entstehung von Glioblastomen dar (Cantor et al. 1999). Ein erhöhtes Risiko für astrogliale Tumoren besteht außerdem bei Exposition mit chlorierten aliphatischen Kohlen-Wasserstoffen (Cocco et al. 1994). Auch bei den Umweltgiften spielen genetische Suszeptibilitätsfaktoren wie Polymorphismen in *Glutathion-S-Transferase*- und *Cytochrom-P-450* Genen mit verlangsamter Metabolisierung toxischer Substanzen eine zusätzliche Rolle (Grant et al. 1995).

Auch physikalische Umweltfaktoren sind untersucht worden, wobei man zeigen konnte, dass die Arbeit an elektrischen Maschinen (Rodvall et al. 1998a) oder der Gebrauch elektrischer Geräte im Haushalt (Mutnick et al. 1997) keine Bedeutung bei der Entstehung von Gliomen hat. Die Arbeit in Magnetfeldern ab einer Feldstärke von 0.4 microT stellt allerdings einen Risikofaktor dar (Rodvall et al. 1998a). Eine weitere wichtige physikalische Noxe ist die ionisierende Strahlung. Sowohl die Röntgendiagnostik von kraniellen (Wrensch et al. 2000) als auch von dentalen (Rodvall et al. 1998b) Prozessen zeigen kein erhöhtes Risiko für Gliome, es gibt aber durchaus Hinweise, dass therapeutische Schädelbestrahlungen einen Risikofaktor darstellen. So konnten Gliome als Spätkomplikationen nach Ganzhirnbestrahlungen von ALL-Patienten im Kindesalter diagnostiziert werden, besonders bei stattgehabtem ZNS-Befall im Rahmen einer Leukämie (Walter et al. 1998).

Kein erhöhtes Risiko, an einem Gliom zu erkranken, haben Menschen mit Amalgam-Füllungen, und zwar unabhängig davon, wieviel Amalgam-Füllungen vorhanden sind (Rodvall et al. 1998b).

Interessant und sicher wichtig ist auch die Frage, ob der Gebrauch von Mobil-Telefonen ein Risiko darstellt. Mehrere Arbeiten sind zu diesem Thema erschienen. Für digitale Systeme konnte auch in aktuellen Studien kein signifikantes Risiko nachgewiesen werden, ein erhöhtes Risiko konnte allerdings für analoge Systeme auf der "Telefon-Seite" gezeigt werden (Hardell et al. 1999). Weitere Studien müssen hier sicher noch folgen.

Das Immunsystem, welches einen etablierten Platz in Tumorigenese-Modellen hat, scheint auch bei Glioblastomen eine Rolle zu spielen. So zeigten einige Arbeiten, dass Gliom-Patienten seltener an allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale und atopischem Ekzem leiden (Hochberg et al. 1990, Schlehofer et al. 1999), andere Autoren konnten allerdings keine inverse Korrelation zwischen allergischen Erkrankungen und dem Gliom-Risiko erkennen (Cicuttini et al. 1997).

Aktuelle Untersuchungen zeigen allerdings auch, dass Patienten mit diesen Tumoren signifikant seltener sowohl an Masern als auch an Varizellen erkranken bzw. als Kinder erkrankt sind (Wrensch et al. 1997) und auch signifikant niedrigere Antikörper-Titer gegen diese Viren aufweisen, dafür aber höhere Herpes simplex- und Zytomegalie-Virus IgG Spiegel zeigen (Wrensch et al. 2001).

Mehrere Arbeiten mit unterschiedlicher Datenlage existieren zur Frage, ob Schädel-Hirn-Traumata mit der Entstehung von Glioblastomen zu tun haben können. Neueren Untersuchungen zufolge scheint vor allem bei Männern das Risiko für Gliome durch Schädel-Hirn-Traumata leicht erhöht zu sein, etwas deutlicher gilt dies allerdings für Meningeome (Preston-Martin et al. 1998, Wrensch et al. 2000).

Epilepsien gelten ebenfalls als Erkrankung mit erhöhtem Risiko für die Entstehung von Gliomen, wobei das Risiko auch bei antiepileptischer Therapie erhöht bleibt (Schlehofer et al. 1999).

Abschließend soll noch über die genetischen Faktoren als Ursache bzw. Risikofaktoren für Gliome berichtet werden. Es gibt Arbeiten, die zwar kein statistisch signifikantes, aber immerhin ein suggestives Risiko für Verwandte

1. und 2. Grades von Gliom-Patienten annehmen (Zampieri et al. 1994), während andere Autoren keinerlei Risiko für Verwandte sehen (Sakas et al. 1994). Interessanterweise konnte man bei Gliom-Patienten signifikant mehr spontane Chromosomenbrüche in normalen Blutlymphozyten detektieren als bei gesunden Kontroll-Personen als Zeichen einer genetisch bedingten Suszeptibilität für Gliome (El-Zein et al. 1999). Ein weiterer Hinweis für genetische Faktoren als Mitursache für die Entstehung von Gliomen sind *TP53* Keimzellmutationen, die auch für das Li-Fraumeni-Syndrom verantwortlich sind. Diese findet man nämlich signifikant häufiger bei Patienten mit multifokalen Gliomen und bei Gliom-Patienten mit positiver Familienanamnese für maligne Erkrankungen (Kyritsis et al. 1994).

Abschließend sei noch an dieser Stelle auf die sogenannten `Brain-Tumour-Polyposis` (BTP)-Syndrome, oft bekannt unter dem Namen *Turcot*-Syndrome, hingewiesen. Patienten mit dem BTP-Syndrom Typ1, neuerdings auch als `wahres` oder autosomal rezessiv vererbtes *Turcot*-Syndrom bezeichnet, entwickeln kolorektale Adenome und Karzinome, ohne oder mit nur geringer (<100 Adenome) vorbestehender Polyposis, und vor allem Glioblastome. Dieses Syndrom mit den charakteristischen Keimzellmutationen in einem der Fehlpaarungs- oder *Mismatch*-Reparatur (*MMR*) Gene ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. Bei der einleitenden Darstellung der Biologie des Mismatch-Reparatur-Systems in den Abschnitten 1.3.2 und 1.3.3 wird daher noch einmal gesondert auf dieses Syndrom eingegangen. Patienten mit BTP-Syndrom Typ 2, auch als autosomal dominantes *Turcot*-Syndrom bezeichnet, dagegen zeigen Mutationen in dem APC-Gen und entwickeln neben den kolorektalen Karzinomen vor allem Medulloblastome (Sunahara et al. 2000).

#### 1.2.4 Pathogenese und molekulare Pathologie

Die Karzinogenese von zahlreichen humanen Tumoren ist ein mehrschrittiger Prozess. In einigen Neoplasien sind die Stadien der malignen Transformation teilweise sehr gut charakterisiert, so z.B. die Adenom-Karzinom-Sequenz bei kolorektalen Karzinomen (Vogelstein et al. 1988). Mittlerweile gelten die

morphologischen Veränderungen bei der malignen Progression als Produkt der sequentiellen Aquisition genetischer Veränderungen in malignen Tumoren (Kleihues et al. 2000).

Bei den Tumoren des ZNS sind es vor allem die astrozytären Gliome, die hinsichtlich ihrer Pathogenese und molekularen Pathologie am besten untersucht sind. Wegen der ausgeprägten Tendenz zur diffusen Infiltration in angrenzendes Hirnparenchym rezidivieren niedriggradige Astrozytome nahezu ohne Ausnahme. Bei den Rezidivtumoren beobachtet man zudem regelmäßig eine Transition zu höhergradigen Gliomen, so schließlich auch zu Glioblastomen. Diese Glioblastome, die sich aus niedriggradigen Vorstufen entwickeln, werden als sog. sekundäre Glioblastome bezeichnet. Solche, die sich schnell entwickeln, ohne dass ein solcher Vorläufer-Tumor bestanden hat bzw. objektivierbar war, werden als primäre oder *de novo* Glioblastome bezeichnet (Kleihues und Ohgaki 2000). Diese Terminologie wurde bereits erstmalig im Jahr 1940 benutzt (Scherer et al. 1940), trotzdem handelt es sich bei der Unterscheidung zwischen primären und sekundären Glioblastomen eher um ein Konzept als um diagnostisch etablierte Entitäten. Ein Hauptgrund dafür ist, dass beide Glioblastom-Typen die gleichen histologischen Charakteristika aufweisen, so dass es umstritten ist, ob man beide Typen auch histopathologisch differenzieren kann. Diese Schwierigkeit bei der sicheren histopathologischen Differenzierung macht es ebenfalls schwierig die relativen Häufigkeiten zu bestimmen. Man geht heute allerdings davon aus, dass die primären Tumoren bei weitem überwiegen, etwa in einer Größenordnung von ca. 80 % (Dropcho et al. 1996).

Obwohl bereits eine nicht unerhebliche Zahl genetischer Veränderungen in astroglialen Tumoren identifiziert werden konnte, ist man sicher auch heute noch weit davon entfernt alle Veränderungen und vor allem das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Mutationen zu verstehen. Im folgenden soll nun auf die bekannten Veränderungen, vor allem auch im Hinblick auf die Unterscheidung zwischen primären und sekundären Glioblastomen, eingegangen werden.

*TP53* Mutationen waren mit die ersten genetischen Läsionen, die in astrozytären Tumoren identifiziert wurden (Nigro et al. 1989). Mutationen dieses Tumorsuppressor-Gens sind in primären Glioblastomen allerdings

eher selten und kommen in weniger als 10% dieser Tumoren vor. Bei den sekundären Glioblastomen zeigt sich hingegen eine andere Situation, hier findet man in deutlich über 65% *TP53* Mutationen (Kleihues und Ohgaki 2000). Weitaus häufiger als Mutationen sind *TP53* Protein-Stabilisierungen (Louis et al. 1993). Auch dieses Phänomen findet man bei den sekundären Tumoren mit über 90% weitaus häufiger als in den primären Glioblastomen mit etwa 35% (Kleihues und Ohgaki 2000).

Das *MDM2* Gen enthält eine DNA Bindungsstelle für das *TP53* Protein und es konnte gezeigt werden, dass *MDM2* durch das *TP53* Protein induziert wird (Barak et al. 1994). Das *MDM2* Protein wiederum komplexiert mit dem *TP53* Protein und inaktiviert dessen transkriptionelle Aktivität im Sinne einer Feedback Schleife (Kleihues und Ohgaki 2000). In mehr als 50% aller primären Glioblastome findet man eine *MDM2* Überexpression, wogegen weniger als 10% der sekundären Tumore dieses Phänomen zeigen (Biernat et al. 1997). Amplifikationen des *MDM2* Genes finden sich in weniger als 10% aller Glioblastome, wobei es sich wohl aber nur um primäre Tumoren handelt, die *TP53* Mutationen aufweisen (Reifenberger et al. 1993). Sowohl die Überexpression als auch die Amplifikation von *MDM2* führt über eine Proteinkomplexierung oder eine transkriptionelle Inaktivierung zu einem funktionellen *TP53* Protein Verlust.

Der *CDKN2A* Locus codiert durch Unterschiede im ersten Exon und alternative Leserahmen im zweiten Exon für 2 verschiedene Genprodukte (p16 und p19<sup>ARF</sup>). Der putative Tumorsuppressor p19<sup>ARF</sup> blockiert die *MDM2* induzierte *TP53* Protein-Degradation (Pomerantz et al. 1998). Das p16 Protein hingegen inhibiert die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6, was wiederum zu einer Reduktion der Phosphorylierung des Rb-Proteins führt. *Rb* steht für Retinoblastom-Gen und bezeichnet einen Zell-Zyklus regulierenden Faktor, der im phosphorylierten Zustand den Übergang von G<sub>1</sub> in S induziert. Dadurch führt das p16 Protein zu einer Transition der G<sub>1</sub>/S Phase im Zellzyklus. *Rb* Alterationen und *p16* Deletionen schließen sich sowohl in primären als auch sekundären Glioblastomen nahezu aus, der Verlust von *Rb* Expression oder *CDK4* Amplifikationen zeigte sich in beiden Glioblastomtypen gleich häufig, *p16* Deletionen fanden sich dagegen in primären Tumoren signifikant häufiger (Biernat et al. 1994 /1997 ).



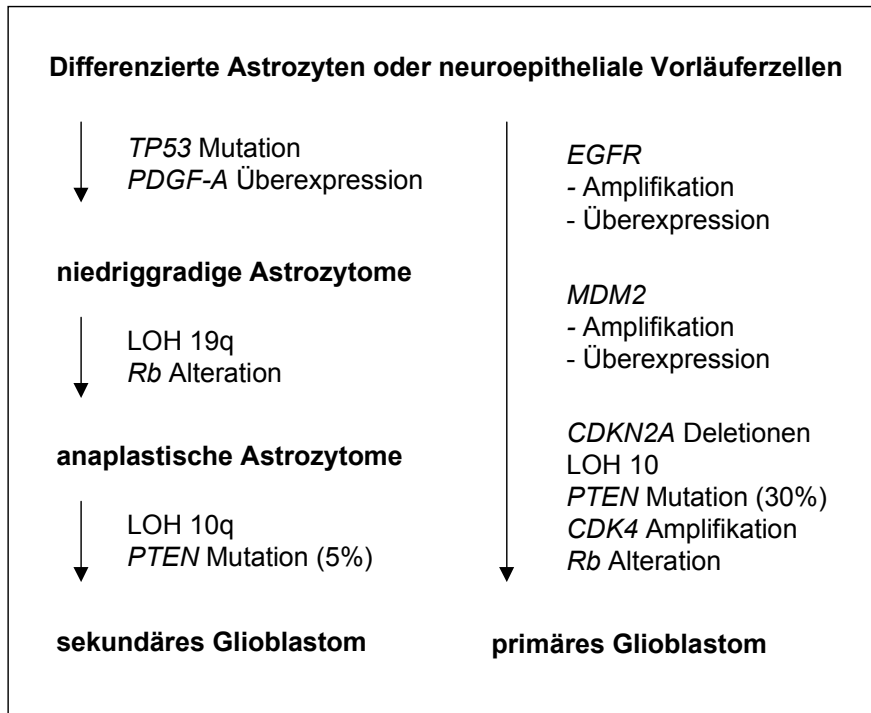
Das *EGFR* (*Epith. Growth Factor Receptor*) Gen ist ebenfalls in der Kontrolle von Zellzyklus und Proliferation involviert und zeigt sich in mehr als einem Drittel aller Glioblastome amplifiziert oder überexprimiert (Libermann et al. 1985). Die daraus resultierende Überfunktion des *EGFR* Signalweges führt so zu Proliferation und Tumorprogression. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass etwa 40% aller primären Glioblastome *EGFR* Amplifikationen aufweisen, dagegen konnte in keinem von 22 untersuchten sekundären Tumoren *EGFR* Amplifikationen nachgewiesen werden (Tohma et al. 1998). Glioblastome mit *EGFR* Amplifikationen zeigen typischerweise häufig Chromosom 10 Verluste, dagegen scheinen sich *TP53* Mutationen und *EGFR* Überexpressionen nahezu auszuschließen (Kleihues und Ohgaki 2000).

*PDGF-alpha* Überexpressionen wurden sowohl in niedriggradigen als auch in höhergradigen Gliomen gefunden, außerdem zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der *PDGF-alpha* Überexpression und einem LOH (Loss of Heterozygosity) auf Chromosom 17p, was darauf hinweist, dass diese Veränderungen eine Rolle bei der Pathogenese der sekundären Glioblastome spielen (Herrmanson et al. 1996).

Die häufigsten genetischen Veränderungen in Glioblastomen sind LOHs auf großen Teilen von Chromosom 10 bzw. Deletionen des Chromosomes 10 (Kleihues et al. 2000). Das Tumorsuppressor Gen *PTEN* auf Chromosom 10q23.3 ist in etwa 30% aller Glioblastome mutiert. Eine recht aktuelle Arbeit konnte zeigen, dass *PTEN* Mutationen fast ausschließlich in primären Glioblastomen auftreten (Tohma et al. 1998), außerdem scheinen sich *TP53* und *PTEN* Mutationen nahezu auszuschließen (Rasheed et al. 1997). Interessanterweise konnte ein kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigen, dass *PTEN* das *TP53* Protein vor der *MDM2* bedingten *TP53* Protein Degradation schützt und so Tumorzellen gegenüber Zytostatika sensibel macht (Mayo et al. 2002). Auf die Problematik der Chemoresistenz auch im Zusammenhang mit *TP53* wird allerdings in den folgenden Abschnitten ausführlich eingegangen.

Abgesehen von ein paar Überlappungen ist die Pathogenese und molekulare Pathologie beider Glioblastom-Subtypen doch deutlich verschieden, so dass man sowohl aus molekulargenetischer als auch aus klinischer Sicht von

verschiedenen Tumoren mit entsprechender eigener Tumorbilologie ausgehen kann. **Abbildung 1** soll die verschiedenen Progressionswege zum Glioblastom nocheinmal veranschaulichen.



**Abbildung 1:** Klinisch und genetisch definierte Progressionswege zum Glioblastom, modifiziert nach Kleihues und Ohgaki 2000.

Das für die vorliegende Arbeit besonders interessante Fehlpaarungs- bzw. *Mismatch*-Reparatur (MMR)-System ist hinsichtlich der Bedeutung für Pathogenese und Progression in malignen Gliomen noch nicht hinreichend untersucht. So existieren auch keine Daten, ob sich primäre und sekundäre Glioblastome hinsichtlich der Expression oder Mutationsfrequenz der MMR-Gene unterscheiden. Interessanterweise gibt es Hinweise dafür, dass das MMR-System DNA-Schäden detektiert und über eine TP53 Proteinstabilisierung apoptotische Mechanismen aktiviert (Hickman et al. 1999). Zudem hat man ein TP53-response-Element in einem MMR-Gen identifiziert, was weitere Hinweise für eine funktionelle Interaktion für das MMR-System und TP53 gibt (Warnick et al. 2001). Da es deutliche Unterschiede von TP53 Mutationen und funktioneller TP53 Proteinstabilisierungen zwischen primären und sekundären Glioblastomen gibt, sind

auch hinsichtlich des MMR-Status signifikante Unterschiede zwischen beiden Tumorentitäten denkbar.

### 1.2.5 Therapeutische Strategien und Prognose

Die Diagnose eines GBM kann nur nach histopathologischer Untersuchung sicher gestellt werden. Bei der klinischen Verdachtsdiagnose, die vor allem auf einer differenzierten Bildgebung mittels MRT beruht, ist daher eine histopathologische Sicherung der Diagnose anzustreben. Dies sollte, wenn der Tumor technisch und der Patient aus medizinischer Sicht operabel ist, im Rahmen einer neurochirurgischen Resektion durchgeführt werden. Ist eine offene Operation nicht möglich, sollte mittels stereotaktischer Biopsie eine histopathologische Diagnose herbeigeführt werden. Die Sicherung der Diagnose ist vor allem zur Abgrenzung von lymphatischen Tumoren des ZNS wichtig, da für diese Neoplasien völlig andere therapeutische Strategien bzw. Optionen bestehen.

Sofern möglich, steht also am Anfang des Therapie-Algorithmus maligner Gliome die neurochirurgische Resektion. Dieses Vorgehen ist aus mehreren Gründen sinnvoll. Zum einen kann so, wie oben dargestellt, mit dem gewonnenen Tumormaterial eine sichere Diagnose gestellt werden. Ein weiterer Grund für die initiale Resektion ist die Verbesserung der klinischen Situation des Patienten durch Reduktion des raumfordernden Prozesses (Prados und Levin 2000). Für die malignen Gliome gilt außerdem, dass die Resektion mit der Überlebenszeit zusammenhängt. So zeigen schon Daten, die zwischen 1970 und 1980 erhoben wurden, dass die durchschnittliche Überlebenszeit von etwa 3 Monaten ohne Therapie auf 8 Monate nach neurochirurgischer Therapie ansteigt (Salcman et al. 1980). Das Ausmaß der Resektion hängt mit der Überlebenszeit zusammen, so dass heute im Zeitalter differenzierter mikrochirurgischer Techniken so viel Tumormasse wie möglich entfernt werden sollte (Prados und Levin 2000). Eine Heilung ist auf Grund der extremen diffusen Infiltration dieser Tumore durch chirurgische Resektion allein auch heute nicht möglich (Hofer und Herrmann 2001).

Postoperativ schließt sich eine Strahlentherapie an. Diese bestand früher aus einer Ganzhirnbestrahlung mit 4500 rad und einer zusätzlichen Herddosis

von 2500 rad und hob die durchschnittliche Überlebenszeit auf etwa 9-10 Monate an (Salzman et al. 1980). Da jedoch die Ganzhirnbestrahlung mit einem sehr hohen Risiko einer Strahlenezephalopathie behaftet ist und keinen prognostischen Vorteil hat, bestehen heutige Bestrahlungsprotokolle ausschließlich aus einer Herdbestrahlung. Die weiße Substanz des ZNS ist der begrenzende Faktor bei der Radiotherapie, so dass die Herddosen heute bei etwa 60 Gy liegen bei täglicher Applikation bis die Herddosis erreicht ist (Prados und Levin 2000). Die Prognose ist auch heute ähnlich, die Bestrahlung verlängert die Überlebenszeit auf durchschnittlich 9-10 Monate, Langzeitüberlebende, die länger als 2 Jahre nach der Erstdiagnose noch leben, gibt es nach alleiniger Radiatio nur vereinzelt. Alternative Radiotherapien beinhalten hyperfraktionierte, acceleriert fraktionierte, d.h. schneller aufeinanderfolgende, Bestrahlungen, die Brachytherapie und die sog. Radiochirurgie. Die verschiedenen Fraktionierungen zeigten in verschiedenen Phase III Studien keine signifikanten Überlebensvorteile (Prados und Levin 2000). Die Brachytherapie mit hochaktiven Iod-125 Seeds zeigt bei vorsichtiger Auswahl des Patientenkollektivs, dass ein Überlebenszeitgewinn möglich ist, 40-55% der behandelten Patienten müssen allerdings wegen symptomatischer strahleninduzierter Nekrosen zwischen 6 Monaten und 2 Jahren nach der Brachytherapie neurochirurgisch behandelt werden (McDermott et al. 1990). Ein interessanter radiotherapeutischer Ansatz zur Intensivierung der Herddosis bei Schonung des umliegenden Parenchyms ist die sog. Radiochirurgie. Hierbei werden mit Hilfe der Stereotaxie ganz gezielt mit dem *Gamma Knife* (AB Elektra, Stockholm, Schweden) oder mit Linearbeschleunigern zahlreiche Strahlengänge auf ein kleines Isozentrum konvergiert. Da auch bei dieser Methode Strahlennekrosen des umliegenden Hirngewebes induziert werden können und dieses Risiko um so größer ist, je größer die bestrahlte Läsion ist, werden vor allem kleine und tief liegende Tumore mit der Radiochirurgie behandelt. Derzeit läuft eine Phase III Studie der *Radiation Therapy Oncology Group*, ob Radiochirurgie vor externer Strahlentherapie eines neu diagnostizierten Glioblastoms einen prognostischen Vorteil erbringt (Prados und Levin 2000).

Das dritte Standbein der Glioblastom-Therapie ist die Chemotherapie. Da die Problematik der Chemotherapie ein entscheidender Punkt dieser Arbeit ist, soll darüber in einem gesonderten Abschnitt berichtet werden (siehe 1.2.6). Kurz seien an dieser Stelle noch die Immuntherapie und die Gen- bzw. Molekular-Therapie des Glioblastoms erwähnt. Immunologische Strategien versuchen über zytotoxische Zytokine, Antikörper oder Vaccinierungen sowohl allein als auch in Kombination mit Chemotherapie diese Tumoren zu beherrschen (Roth et al. 1999). Zur sog. Molekularen Therapie zählt man Versuche, Tumor-Supressor- oder Zell-Zyklus regulierende Gene, Inhibitoren von Wachstumsfaktoren bzw. derer Rezeptoren, Inhibitoren der Neovaskularisation, onkolytische Viren oder Inhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen in die Tumorzellen einzubringen (Karpati et al. 1999). Substantielles klinisches Potential hat möglicherweise die Adenovirus basierte Gentherapie maligner Gliome mit Herpes simplex Virus (HSV)-Thymidinkinase und gleichzeitiger Verabreichung von Ganciclovir. Im Tierversuch konnten so maligne Gliome in Nacktmäusen effizient mit einem die HSV-Thymidinkinase tragenden Adenovirus transduziert werden und mit einer anschließenden Therapie mit Ganciclovir signifikant remittiert werden (Chen et al. 1994). Klinisch erscheint die Kombination dieser genetischen Therapie mit einer Betsrahlung möglicherweise noch effektiver (Kim et al. 1994/1997).

#### 1.2.6 Chemotherapie beim Glioblastoma multiforme

Wie bereits in Abschnitt 1.2.5 dargestellt, ist eine überzeugende kurative Situation mit chirurgischen Verfahren und der Strahlentherapie zumindest zum heutigen Zeitpunkt nicht zu erreichen. Das extrem diffus infiltrierende Glioblastom kann durch eine lokal wirksame Therapie wie die chirurgische Resektion nicht kontrolliert werden. Dies zeigt die Tatsache, dass über 90% der Tumore trotz oft "vollständiger" Resektion innerhalb von 2cm von der Primärtumorlokalisation rezidivieren (Burger et al. 1988, Hofer und Herrmann 2001). Um dieser diffusen, grenzenlosen Verteilung des Tumores gerecht zu werden, müssen so systemische Therapien wirksam werden, die maligne

Zellen auch weit außerhalb der Primärlokalisierung treffen. Ein für zahlreiche verschiedene Tumoren etabliertes systemische Verfahren mit viel klinischer Erfahrung ist die Chemotherapie. Die ersten Studien, die neben Chirurgie und Radiatio auch die Chemotherapie beim Glioblastom untersuchten, gab es Mitte der 60ziger Jahre (Kennedy et al. 1965, Ransohoff et al. 1965). Die in erster Linie verwendeten Medikamente waren die Derivate des Nitrosoharnstoffs. Mit dieser Substanzklasse wurde über Ansprechraten zwischen 10% und 40% berichtet, allerdings ohne Untersuchung mit der damals noch nicht verfügbaren Computertomographie. Einige der nachfolgenden Studien mit Nitrosoharnstoffen zeigten dann einen kleinen Benefit für Glioblastom-Patienten (Fine et al. 1993), andere Arbeiten allerdings bezweifelten diesen prognostisch günstigen Effekt dieser Medikamente (Curran et al. 1993).

Die Nitrosoharnstoff-Derivate, biochemisch sehr lipophile Substanzen, wurden vor allem wegen der guten Penetration durch die Bluthirnschranke eingesetzt, wobei das Problem der Bluthirnschranke nach aktuellen Erkenntnissen wahrscheinlich etwas überinterpretiert wurde. Wie CT-Kontrastmitteluntersuchungen und Liquor-Analysen heute zeigen, ist im Bereich des Tumors nicht von der normalen Bluthirnschrankenfunktion auszugehen (Hofer und Herrmann 2001). Modifikationen der klassischen Chemotherapie mit Nitrosoharnstoff-Derivaten betreffen die Art der Applikation, die Dosis und die Pharmakogalenik. So zeigten die intraarterielle Applikation und die Hochdosis-Therapie keinen prognostischen Vorteil (Hofer und Herrmann 2001). Die Applikation direkt in den Tumor mit BCNU enthaltenen biodegradierbaren Polymeren zeigte ein kleinen prognostischen Vorteil vor allem bei Glioblastompatienten, weitere Untersuchungen müssen aber noch folgen (Brem et al. 1995).

Nitrosoharnstoffe werden allerdings nicht nur als Monotherapien eingesetzt, sie bilden auch einen wichtigen Pfeiler von Polychemotherapie-Protokollen. So wird das CCNU zusammen mit Procarbazin und Vincristin im PCV-Schema eingesetzt. Das PCV-Chemotherapie-Protokoll, welches als erstes von Levin beschrieben wurde (Levin et al. 1985), gilt heute als Standard-Therapie bei der Behandlung von oligodendroglialen Tumoren. Aber auch bei astroglialen Tumoren, vor allem bei Glioblastomen, wurde die Wirksamkeit

dieses Protokolls in zahlreichen Studien untersucht. Aufgrund unzureichender Response-Kriterien und Stratifizierungen gibt es aber weniger verlässliche Daten. Nach einer Untersuchung von Prados und Mitarbeiter hat das PCV-Schema keinen Benefit als Zusatz zur etablierten Chirurgie und Bestrahlung (Prados et al. 1999). Heute stellt das PCV-Schema ein Standard-Schema dar zum Vergleich mit anderen Medikamenten in neuen Phase III-Studien, genauso wie die Monotherapie mit BCNU, gegenüber der das PCV Schema nicht überlegen ist (Prados et al. 1999).

An dieser Stelle soll bereits kurz angemerkt werden, dass ein großer Teil aller Glioblastome bereits *in vitro* resistent gegenüber Nitrosoharnstoffen reagiert, so dass einige Autoren die enttäuschenden Ergebnisse der Chemotherapie bei Glioblastomen auf den vorwiegenden Einsatz dieser Substanzklasse zurückführen (Wolff et al. 1999). Auf das Problem der Chemoresistenz, ein zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit, soll in dem Abschnitt 1.2.7 gesondert eingegangen werden.

An den eben genannten Standardtherapien, BCNU-Monotherapie und PCV, müssen sich andere Medikamente bzw. Zytostatikakombinationen in Studien messen lassen. Ein weiteres interessantes Zytostatikum ist das Alkylans Temozolomid (Temodal), das in Phase II Studien Remissionsraten von 8% und Krankheitsstabilisierungen von immerhin 43% bei Glioblastomen zeigt (Yung et al. 1999). Etwa 15% Remissionen und 55% Stabilisierungen des Krankheitszustandes zeigen Studien mit Topoisomerase-I-Hemmern wie Topotecan und Irinotecan (Friedman et al. 1999a und b). Das wahrscheinlich als unspezifischer Inhibitor der Proteinkinase C wirkende hochdosierte Tamoxifen zeigt ebenfalls Remissionen und Krankheitsstabilisierungen was im Endeffekt einen kleinen Überlebensbenefit im Vergleich mit historischen Kontrollen erbringt (Couldwell et al. 1996). Das Cisplatin, welches bei einer Vielzahl von Tumoren als Bestandteil zahlreicher Polychemotherapie-Protokolle eingesetzt wird, zeigt beim Glioblastoma multiforme keinen signifikanten Vorteil gegenüber dem BCNU als Monotherapie (Kiu et al. 1995). Das Cytosin-Arabinosid in Kombination mit ACNU (Anders et al. 2000), das Methotrexat, vor allem lokal in den Tumor appliziert (Nierenberg et al. 1991), und das als *Radiosensitizer* wirksame und während der

Bestrahlung applizierte Paclitaxel (Taxol) (Julka et al. 2000) zeigen ebenfalls Wirkungen bei der Therapie des Glioblastoms, die aber in Phase III Studien noch vergleichend quantifiziert werden müssen. Das Teniposid (VM26) zeigt sich in Kombination mit CCNU nicht so wirksam wie das PCV-Schema (Jeremic et al. 1992).

Ein interessanter neuer Angriffspunkt ist die Angiogenese. So zeigte eine recht aktuelle klinische Phase II Studie mit dem generell recht gut verträglichen, die Angiogenese hemmenden Thalidomid eine Antitumorwirkung bei einem kleinen Teil der Glioblastompatienten. Diesem, wegen seiner teratogenen Wirkungen gut bekannten, Medikament wird vor allem in Kombination mit Bestrahlung und herkömmlicher Chemotherapie möglicherweise in Zukunft eine Bedeutung zukommen (Fine et al. 2000).

Nicht nur die Wahl der Medikamente ist bei der Chemotherapie des Glioblastoms von Bedeutung, sondern auch der Zeitpunkt der Applikation der zytostatischen Therapie. So gibt es die Möglichkeit schon vor der Bestrahlung zu chemotherapieren, was auch als "neoadjuvante" Therapie beim Glioblastom bezeichnet wird. Es existieren verschiedene Phase II Studien, die unter anderem Cisplatin, Etoposid, BCNU und Paclitaxel im neoadjuvanten Ansatz untersucht haben (Frenay et al. 2000), die Daten sind allerdings nicht konsistent (Hofer und Herrmann 2001). Untersucht wird derzeit auch die "Chemoradiatio", also die gleichzeitige Applikation der systemischen Zytostase und der Bestrahlung. Die auch heute noch routinemäßig eingesetzte Art ist aber die adjuvante Chemotherapie nach Resektion und Radiatio (Hofer und Herrmann 2001).

Trotz all dieser oben beschriebenen komplexen und differenzierten Therapieschemata und Behandlungskonzepte sind die Ergebnisse der Chemotherapie beim Glioblastoma multiforme insgesamt enttäuschend. Es gibt keine konsistenten Daten, die belegen, dass die adjuvante Chemotherapie einen Einfluß auf die durchschnittliche Überlebenszeit hat. Dies galt schon in den siebziger Jahren (Salcman 1980) und hat sich im Endeffekt auch heute nicht geändert (Hofer und Herrmann 2001). Durch die adjuvante Chemotherapie gibt es allerdings etwa 15% langzeitüberlebende Glioblastompatienten, das heißt Überleben von mindestens 18 Monaten nach Diagnosestellung. Im Vergleich dazu leben ohne Chemotherapie nur



höchstens 5% der Patienten länger als 18 Monate nach Erstdiagnose (Hofer und Herrmann 2001). Es gibt also möglicherweise ein Kollektiv unter den Glioblastompatienten, die besonders gut auf die Chemotherapie ansprechen. Überzeugende prognostische Parameter, die eine prädiktive Aussage darüber machen können, welche Patienten besonders gut ansprechen, gibt es allerdings bisher für die astroglialen Tumore nicht (deAngelis et al. 1998). Die optimale Chemotherapie für Glioblastompatienten gibt es bis heute nicht und weitere Studien müssen zu dieser Problematik erarbeitet werden (Hofer und Herrmann 2001).

Ein entscheidendes Problem der Chemotherapie dieses malignen glialen Tumors ist sowohl die primäre Resistenz als auch die sekundär erworbene Resistenz auf zahlreiche Zytostatika (Prados und Levin 2000). Da diese Chemoresistenz eine weitere entscheidende Problematik ist, die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegt, soll darüber in dem folgenden Abschnitt 1.2.7 berichtet werden.

### 1.2.7 Chemoresistenz

Wie bereits im vorangehenden Abschnitt angemerkt wurde, besteht ein Hauptproblem der systemischen Therapie des Glioblastoms in der ausgeprägten Chemoresistenz dieses Tumors. Um effektive therapeutische Strategien entwickeln zu können, ist so das Verständnis von Resistenzmechanismen eine entscheidende Voraussetzung. In diesem Abschnitt soll deshalb zunächst systematisch und dann vor allem im Hinblick auf Glioblastome über Chemoresistenz-Mechanismen berichtet werden.

Grundsätzlich unterscheidet man primäre Resistenzen, d.h. Resistenzen, die bereits vor Einleitung der Chemotherapie vorhanden sind, und sekundäre Resistenzen, d.h. Widerstandsfähigkeit gegenüber einem Medikament, welche sich erst im Rahmen der Chemotherapie mit diesem Medikament entwickelt. Diese sekundären Resistenzen entstehen vor allem durch Selektionsprozesse, in denen wenige, entweder primäre oder durch Mutationen entstandene, resistente Zellklone gegenüber den sensiblen Tumorzellen einen Wachstumsvorteil bekommen. Diese resistenten Zellklone

überwachsen die anderen Tumoranteile, so dass die Haupttumormasse schließlich klinisch resistent wird. Beide Typen der Resistenz spielen bei malignen Gliomen eine Rolle (Prados und Levin 2000).

Durch deutliche Fortschritte beim Verständnis der Tumor-Zellbiologie in den letzten Jahren kennt man heute eine Reihe von Resistenzmechanismen in malignen Zellen (Bates et al. 1994), die an dieser Stelle, vor allem im Hinblick auf Glioblastome, erörtert werden sollen.

Zu diesen Mechanismen gehören zum Beispiel Veränderungen des Medikamententransportes der Tumorzellen. Ein bekanntes Beispiel sind die *Multi-Drug-Resistance (MDR)*-Proteine oder P-Glykoproteine, die eine Vielzahl von Zytostatika wieder aus der Tumorzelle ausschleusen. Andere Mechanismen betreffen den Medikamenten-Metabolismus. So führt eine Überexpression sowohl von Glutathion-S-Transferase als auch von Metallothionein zu einer Inaktivierung von vor allem Alkylantien und Cisplatin. Vermehrte Aktivitäten von Enzymen wie Bleomycinhydrolase, Dihydrofolat- und andere Reduktasen reduzieren den Gehalt an aktiven Zytostatika intrazellulär. Da ein großer Teil der Chemotherapeutika über eine DNA-Schädigung wirksam wird, spielen DNA-Reparaturmechanismen ebenfalls eine wichtige Rolle. So kennt man Überexpression von O6-Alkyl-Guanin-Alkyltransferase (AGAT), die zu Resistenzen gegenüber Alkylantien wie den Nitrosoharnstoff-Derivaten führt. Defekte *Mismatch-Reparatur (MMR)*-Mechanismen kennt man zum einen als Ursache der sogenannten *Hereditären Non-Polyposis Kolon Karzinome (HNPCC)*, zum anderen aber auch als Ursache von Chemoresistenzen in verschiedenen Tumoren. Veränderungen von sogenannten Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen, eine heterogene Gruppe von Genen, die vor allem in die Zell-Zyklus-Regulation und Apoptose eingreifen, führen zur schrittweisen malignen Transformation von Zellen oder Zellverbänden. Da aber auch zytostatische Substanzen sich vor allem durch DNA-Schäden der Apoptose bedienen und in den Zellzyklus eingreifen, führen Veränderungen dieser Gene bzw. Genprodukte zur Chemoresistenz (El-Deiry et al. 1997). So findet man bei Mutation von *TP53*, einem potenten Apoptoseinduktor, sowohl Tumorinduktion und Tumorprogression als auch Chemoresistenz und damit eine schlechte Prognose. Beim Glioblastoma multiforme ist es eben diese

Chemoresistenz, die die systemische zytostatische Therapie so problematisch gestaltet. Sie ist vor allem bedingt durch eine Überexpression von AGAT und durch Veränderungen im Mismatch-Repair (MMR) System (Prados und Levin 2000). Außerdem findet man Defekte von *TP53*, sowohl in Form von Mutationen als auch funktionellen Protein-Stabilisierungen, die vor allem in Verbindung mit DNA-Reparatur-Defekten zu Chemoresistenzen führen können (Lin et al. 2001, Prados und Levin 2000).

Da, wie bereits oben ausgeführt, die Chemoresistenz bei den Glioblastomen ein Hauptproblem bei einer suffizienten Therapie darstellt, sind Chemoresistenztestungen *in-vitro* etabliert worden, über die in einem gesonderten Abschnitt ausführlicher berichtet werden soll.

#### 1.2.8 Chemosensitivitäts-Testung *in vitro*

Verschiedene Assays wurden entwickelt mit dem Ziel, die klinische Sensitivität eines Tumors für ein Chemotherapeutikum vorauszusagen. Der *Colony Forming Assay* (CFA) (Hamburger und Salmon 1977) und colorimetrische Tests wie der Methylthiazol-Diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT) (Kornblith et al. 1981) sind die am häufigsten verwendeten Methoden, ohne dass diese den anderen mikrozytotoxischen- oder den radioaktiv markierten Vorläufer-Inhibitor-Methoden überlegen sind (Kimmel et al. 1987). Alle diese Testsysteme haben das Problem, dass sie lediglich die Verhältnisse *in vitro* untersuchen und die komplexen Verhältnisse der klinischen Situation *in vivo* nicht ausreichend simulieren können. Entsprechend dem vor allem für die Chemotherapie beim Glioblastom benutzten Nitrosoharnstoff-Derivat BCNU gibt es hierzu die meisten Daten. So konnte in einem CFA-Ansatz gezeigt werden, dass etwa 40% der Glioblastome *in vitro* noch sensitiv reagierten, wovon noch 71% auch *in vivo* Sensitivität zeigten. Alle *in vitro* resistent getesteten Gliome waren auch *in vivo* resistent, die Prädiktion hinsichtlich der Resistenz betrug also 100%, gegenüber etwa 70% hinsichtlich der Sensitivität (Rosenblum et al. 1984). Ähnliche Daten erhielt man auch im MTT-Assay, die Prädiktion bei der Resistenz betrug 100%, bei der Sensitivität 67% (Kornblith et al. 1981).

Weitere *in vitro-in vivo* Korrelationen anderer Zytostatika findet man zwar, eine durch die *in vitro* Testung basierte Therapie wurde allerdings in keiner Studie durchgeführt, so dass die Gültigkeit dieser *in vitro* Testsysteme weiterhin fraglich ist (Kimmel et al. 1987).

Eine recht aktuelle Metaanalyse über Chemosensitivitätstestungen nimmt an, dass die enttäuschenden Ergebnisse der Chemotherapie bei Glioblastomen auf der Auswahl der Zytostatika, vor allem der Nitrosoharnstoff-Derivate, beruhen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die wirksamsten Medikamente mit der geringsten *lethal concentration*, LC 50, also mit der Konzentration bei der 50% der Tumorzellen sterben, nicht BCNU oder ACNU sind, sondern Vincristin, Mitoxantron, Cisplatin, Methotrexat, Cytosin-Arabinosid und auch Vinblastin, Doxorubicin und Actinomycin D. Die Nitrosoharnstoffe zeigten die höchsten *in vitro* Resistenzen, die ja, wie oben ausgeführt, auch einen sehr hohen prädiktiven Wert haben (Wolff et al. 1999).

### 1.3 Das Fehlpaarungs-(*Mismatch*)-Reparatur-System

#### 1.3.1 Nomenklatur und Bestandteile

Das Phänomen der Fehlpaarungs- oder auch wie im Weiteren bezeichnet *Mismatch*-Reparatur wurde erstmals in Prokaryoten beschrieben, die in der Lage waren Fehlpaarungen von Nucleotiden in Bakteriophagen zu reparieren (Wildenberg und Meselson 1975). Dieses System, das sowohl in Bakterien als auch in Pilzen die *Mismatch*-Reparatur durchführt, wurde ausführlich 1991 beschrieben (Modrich 1991). Bei *E.coli* sind es drei Gene bzw. Proteine die in zwei Hauptwegen arbeiten und als *MutS*, *MutL* und *MutH* bezeichnet werden. Da bei Defekten oder beim Fehlen dieser Proteine die Bakterien einen sogenannten Mutator-Phänotyp annehmen, d.h. dass sie deutlich vermehrt Spontanmutationen aufweisen, wurden die Proteine entsprechend abgekürzt mit "*Mut*" für Mutator-Phänotyp bezeichnet.

Ein entsprechendes homologes Mismatch-Reparatur System wurde 1992 auch in dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen und die entsprechend gefundenen Gene bzw. Proteine wurden als *MSH* für *MutS*-Homolog und *MLH* für *MutL*-Homolog bezeichnet (Reenan et al. 1992). So findet man 6 homologe Gene für das bakterielle *MutS* in Hefepilzen, nämlich *MSH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH4*, *MSH5* und *MSH6*. Für das bakterielle *MutL* findet man in *Saccharomyces cerevisiae* 4 homologe Gene, *MLH1*, *MLH2*, *MLH3* und *PMS1*. *PMS* wiederum ist die Abkürzung für *Post Meiotic Segregation*, was zeigen soll, dass dieses Protein bei der homologen Paarung der Chromosomen in der Meiose eine Rolle spielt.

Im Jahre 1993 führten Kopplungsanalysen an Familien mit dem autosomal dominant vererbten Syndrom der Hereditären Non-Polyposis K(C)olorektalen K(C)arzinome, abgekürzt HNPCC, auch bekannt unter dem Namen *Lynch*-Syndrom, zu einem Suszeptibilitäts-Lokus auf Chromosom 2p (Peltomäki et al. 1993). Ein Kandidaten-Gen an diesem Locus war das humane Homolog des *MutS* Gens in Bakterien bzw. des *MSH2* Gens in Hefepilzen und man nahm an, dass es sich um ein humanes DNA-Mismatch-Reparatur Gen handelte (Leach et al. 1993). Dieses humane Gen wurde dann unabhängig von zwei Arbeitsgruppen kloniert und als *hMSH2* bezeichnet (Fishel et al. 1993, Leach et al. 1993). Der Beweis, dass dieses Gen bzw. der Defekt dieses Genes die Ursache von malignen Tumoren bei Patienten mit dem HNPCC Syndrom ist, konnte von einer der Gruppen geführt werden, indem gezeigt wurde, dass hereditäre Keimzellmutationen im *hMSH2* mit der Krankheit in mehreren HNPCC-Stammbäumen segregierten (Leach et al. 1993). Später folgten Klonierungen von weiteren an der Mismatch-Reparatur beteiligten Proteinen, die ebenfalls an der Prädisposition für HNPCC beteiligt sind, nämlich *hMLH1* (Bronner et al. 1994, Papadopoulos et al. 1994) und *hPMS2* (Nicolaidis et al. 1994). So führte die molekulargenetische Untersuchung des HNPCC-Syndroms zur Entdeckung der ersten drei humanen Mismatch-Reparatur Gene. Später konnten zwei weitere Proteine des humanen Mismatch-Reparatur Systems identifiziert werden. Dies war zum eine das *hMSH6*, auch als *hGTBP*, für GT-bindendes Protein, bezeichnet (Papadopoulos et al. 1995, Palombo et al. 1995), und zum anderen das *hPMS1*, bei dem allerdings bis heute der biochemische Beweis

für eine Beteiligung an der Fehlpaarungs-Reparatur aussteht (Kolodner et al. 1996). Ähnliches gilt für *hMSH4* und *hMSH5*, die nicht an der Mismatch-Reparatur, wohl aber an der reziproken Rekombination und der Segregation der homologen Chromosomen bei der Meiose beteiligt sind (Paquis-Flucklinger et al. 1997, Her und Dogget 1998).

### 1.3.2 Mechanismus und Funktion

Da das Mismatch-Reparatur System ursprünglich in Prokaryoten beschrieben wurde, soll hier kurz der Mechanismus der Mismatch-Reparatur in *E.coli* als Grundlage zum Verständnis der Mechanismen im humanen System dargestellt werden (Lage und Dietel 1999).

Die bakteriellen MMR-Proteine MutS, MutL und MutH arbeiten in zwei Systemen. Zum einen gibt es das Methylierungs-gesteuerte *long-patch* System und zum anderen das *very-short-patch* System. Das erstgenannte System repariert Einzelbasenfehlpaarungen und kleine Insertionen und Deletionen, wie sie bei der DNA-Replikation entstehen. Die spezifische Funktion des *very-short-patch* Systems besteht in der Reparatur von G-T Fehlpaarungen in nicht replizierter DNA, die durch Deamination von Cytosin- und 5-Methylcytosin-Resten entstehen. Das Mismatch, das durch die Replikation entsteht, wird durch das MutS Protein erkannt und gebunden. Diese Bindung aktiviert nun das System. In einem zweiten Schritt bindet das MutL Protein an den Komplex aus fehlgepaarter DNA und MutS. Eine spezifische katalytische Untereinheit ist am MutL Protein bisher nicht gefunden worden, wahrscheinlich arbeitet es als "molekularer Zusammenführer", der ATP-abhängig einen stabilen Komplex zwischen zwei oder mehr Einzelstrang-bindenden Proteinen induziert (Sancar und Hearst 1993). Zusätzlich wird hierbei die DNA-Helicase II (UvrD) benötigt. Dieser Komplex aktiviert nun die Endonuklease MutH, die an einem unmethylierten Adenin in einem GATC Motiv 1-2kb strangauf- oder strangabwärts von dem Mismatch einen Strangbruch katalysiert. Die Methylierung der Adeninreste in den GATC-Motiven wird durch die *dam* Methylase (*dam* für DNA Adenin Methylierung) ausschließlich in dem neu synthetisierten Strang eine kurze

Zeit nach der Replikation durchgeführt. So bleibt die replizierte DNA kurze Zeit hemimethyliert, so dass der neu synthetisierte Strang anhand der noch fehlenden Methylierung erkannt werden kann. In diesem kurzen Zeitfenster kann nun das MMR-System Fehlpaarungen erkennen, ausschneiden und reparieren. In Abhängigkeit von der Lokalisation des durch MutH induzierten Strangbruchs wird der die Fehlpaarung tragende DNA-Abschnitt entweder von einer 3`-5`Exonuklease (Exonuklease I) oder einer 5`-3`Exonuklease (Exonuklease VII) ausgeschnitten. Im Anschluss daran wird ein neuer Strang durch die DNA-Polymerase III synthetisiert und durch DNA-Ligasen wird die Prozedur schließlich durch Verbindung der Stränge beendet (Lage und Dietel 1999).

In Analogie sowohl zu Bakterien als auch zu Hefen ist das Mismatch-Reparatur-System auch beim Menschen strang-spezifisch und gesteuert durch einen Strangbruch in 5` oder 3` Richtung des Mismatches. Der initiale Schritt ist dann die Bindung vom hMSH2 Protein, entweder allein (Fishel et al. 1994) oder dimerisiert mit dem hMSH6 (=hGTBP) Protein (Palombo et al. 1995) oder dem hMSH3 Protein (Acharya et al. 1996), an die DNA Fehlpaarungen. Das Heterodimer hMSH2-hMSH6 wird als hMutS-alpha bezeichnet, das Heterodimer hMSH2-hMSH3 als MutS-beta. Diese Heterodimere besitzen unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen DNA Mismatches. So zeigten biochemische Analysen, dass die beiden Proteinkomplexe zwar überlappende aber nicht identische Bindungsspezifitäten besitzen. Der hMSH2-hMSH6 Protein-Komplex erkennt sowohl Einzelbasenfehlpaarungen als auch multiple Baseninsertionen und Basendeletionen, während der Komplex aus hMSH2 und hMSH3 vor allem längere Insertions- und Deletionsschleifen detektiert (Acharya et al. 1996). Ein weiterer Proteinkomplex aus hMLH1 und hPMS2, genannt hMutL-alpha, trifft nun auf den MutS-alpha oder den MutS-beta Komplex nach der initialen Bindung des Mismatches (Li und Modrich 1995). Die ATP abhängige Formation dieses sog. Reparatur-Initiierungs-Komplexes benötigt das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), der Prozess-aktivierende Faktor von DNA Polymerase delta und epsilon (Gu et al. 1998). Nun wird die exonukleolytische Degradation der DNA von dem Strangbruch bis zur Fehlpaarung, wahrscheinlich durch die 5`Nuklease *flap endonuclease I*

(FEN1), stimuliert durch PCNA, katalysiert (Umar et al. 1996). Dieser Schritt beinhaltet ein Entwinden der DNA durch eine DNA-Helicase. Der Mismatch tragende Abschnitt wird so entfernt und wahrscheinlich durch die DNA Polymerase-delta resynthetisiert und abschließend durch DNA Ligasen wieder in die genomische DNA eingebaut (Longley et al. 1997).

Anders als in Prokaryoten ist das menschliche Mismatch Reparatur System in der Lage Heteroduplices mit Schleifen von bis zu 14 Nukleotiden zu reparieren (Fishel et al. 1994). Dies ist sehr wichtig zur Erhaltung der Integrität des Genoms und wird im folgenden Abschnitt ausführlich beschrieben.

### 1.3.3 Mismatch-Reparatur in Tumorigenese und Chemotherapie-Resistenz

Das MMR-System ist in der Lage Fehlpaarungen, sowohl kurzer als auch längerer Heteroduplex-Schleifen von bis zu 14 Nukleotiden, entlang des gesamten menschlichen Genoms zu reparieren. Besonders häufig betroffen von solchen Heteroduplex-Bildungen, vor allem durch Fehler in der Replikation, sind die sog. Mikrosatelliten. Menschliche DNA enthält zahlreiche Mikrosatelliten. Dies sind repetetive DNA Sequenzen die verstreut sowohl in kodierenden Abschnitten als auch in nicht kodierenden Abschnitten des Genoms liegen. Diese Mikrosatelliten mit zum Teil sehr langen repetetiven DNA Sequenzen können bei Strangverschiebungen während der Replikation große Schleifen entlang der genomischen DNA bilden. Diese Schleifen bzw. Heteroduplices werden vom MMR-System, wie oben dargestellt, erkannt und repariert. Aus diesem Grund führt ein Verlust bzw. ein Defekt im Mismatch-Reparatur-System zu hohen Mutationsraten vor allem in den Mikrosatelliten-Sequenzen sowohl in kodierender als auch in nicht kodierender DNA. So kennt man Mutationen in den Mikrosatelliten des Adenomatösen Polyposis Gens (*APC*) (Huang et al. 1996), des Adenin-Phosphoribosyltransferase Gens (*APRT*) (Hess et al. 1994), des B-Zell Lymphom assoziierten Protein X Gens (*Bax*) (Rampino et al. 1997) und des *transforming growth factor beta Rezeptor Typ II Locus* (Souza et al. 1996). Diese Effekte erklären die wichtige Funktion des Mismatch-Reparatur-



Systems zur Verhinderung von Mutationen und Tumorbildung. Ein großer Teil von Tumoren im Rahmen des HNPCC Syndroms ist durch Mutationen in den MMR Genen verursacht (Modrich und Lahue 1996) und zeigen häufig Mikrosateliten-Instabilitäten (MSI), d.h. Verlängerungen und Verkürzungen kurzer repetitiver Mikrosatelliten-Sequenzen. MMR Defekte und MSI sind neben den HNPCC Tumoren auch bei einer Reihe von sporadischen Tumoren entdeckt worden (Rhyu et al. 1996). So konnte eine verminderte Expression von MMR Genen auch im Glioblastoma multiforme gezeigt werden. Etwa 42% der malignen Gliome exprimierten deutlich vermindert das *hMSH2*, aber auch *hMLH1* und *hPMS1* wurden bei 21% bzw. 18% der glialen Neoplasmen vermindert exprimiert (Wei et al. 1997). Dies wiederum spielt möglicherweise eine Rolle bei der Tumorigenese und Tumorprogression bei Glioblastomen. Mutationen der MMR Gene aber sind in Glioblastomen eher selten (Leung et al. 1998).

Aber nicht nur bei Tumorigenese und Tumorprogression ist das MMR-System beim Glioblastoma multiforme interessant. Wie bereits im Abschnitt 1.2.7 beschrieben, spielt es offenbar auch eine Rolle bei der Chemoresistenz in malignen Gliomen.

Das Zielmolekül von zahlreichen chemotherapeutischen Substanzen ist die DNA. Die Resistenz gegenüber solchen zytotoxischen Agentien könnte so mit der Reparatur-Kapazität in Tumoren zusammenhängen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Aktivität der O-Alkylguanine DNA Alkyltransferase (AGAT) zu einer deutlichen Resistenz gegenüber den alkylierenden Substanzen BCNU und anderen Nitrosoharnstoffderivaten aber auch gegenüber Dacarbazin, Triazen und Triazin führt (Fritz et al. 1991, Preus et al. 1996, Lage et al. 1999). Erhöhte Aktivität der Poly-ADP-Ribose Polymerase, ein Teil der Einzel-Strangbruch-Reparatur, schützt gegen Medikamente wie Cisplatin und Bleomycin (Urade et al. 1989, Chen und Zelle 1994), vermehrt aktive Nukleotid-Exzisions-Reparatur führt zu Resistenzen gegen verschiedene Agentien wie BCNU, Cisplatin und Cyclophosphamid (Calsou und Salles 1993). Die vermehrte Aktivität dieser Reparatur-Enzyme führt zu gesteigerter Reparatur-Kapazität. So können die durch die Chemotherapie gesetzten Schäden an der DNA entfernt werden. Die Apoptose, der sog. programmierte Zelltod, als Antwort auf exzessiven

DNA-Schaden bleibt aus, die Tumorzellen überleben und der Tumor reagiert klinisch resistent. Im Gegensatz dazu fand man bei chemoresistenten Tumorzellen eher keine erhöhten Aktivitäten der MMR Gene. Trotzdem ist in mehreren Studien gezeigt worden, dass das MMR-System eine wichtige Rolle bei der Chemoresistenz bei verschiedenen Tumoren spielt, so auch bei Glioblastomen (Friedman et al. 1997, Prados und Levin 2000). Interessanterweise wurde bei resistenten Tumoren eine verminderte Aktivität des Mismatch-Reparatur-Systems gesehen. Erklärt wird dieses zunächst widersprüchlich erscheinende Phänomen dadurch, dass die MMR-Proteine nicht nur wie der Name nahelegt bei Reparaturprozessen eine wichtige Rolle spielen, sondern auch bei der Initiierung des programmierten Zelltodes, der Apoptose, entscheidende Funktionen übernehmen. Vor allem dann, wenn der DNA-Schaden sehr ausgeprägt ist, wie beispielsweise bei Exposition gegenüber Zytostatika, werden diese apoptotischen Signalwege über MMR Proteine aktiviert, um die Integrität des Genoms und damit auch die Integrität des Gesamtorganismus zu wahren (Lage und Dietel 1999). So kann es durch Defekte im MMR-System zu Chemoresistenzen kommen, einmal direkt durch Fehler bei der DNA Schadenserkennung und Ausbleiben der Apoptose, zum anderen aber auch indirekt durch vermehrte Mutationen in anderen Chemoresistenz-Genen. Es konnte gezeigt werden, dass MMR defiziente Zellen eine 100 bis 1000 fach erhöhte Mutationsrate *im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase* Gen haben (Aebi et al. 1996). Dieses Enzym ist essentiell zur zytotoxischen Aktivierung von 6-Thioguanin, Defekte dieses Enzyms führen so zu Resistenzen gegenüber diesem Chemotherapeutikum. Die Hypothese, dass das MMR-System eine Rolle bei der zellulären Hömeostase spielt, wird durch zahlreiche Argumente unterstützt. So zeigt sich, dass das System bei dem G2 Zell-Zyklus Arrest eine Rolle spielt (Hawn et al. 1995), Zellen mit intaktem MMR-System zeigen einen G1 und G2 Arrest nach Exposition mit 6-Thioguanin, während MMR defiziente Tumorzellen keinen G2 Arrest, sondern lediglich eine G1 Verzögerung aufwiesen (Brown et al. 1997). Dies zeigt deutlich, dass das MMR-System mit dem G2 check-point interagiert. MMR defekte Zellen zeigten deutlich verminderte apoptotische Aktivitäten, möglicherweise als Resultat des fehlenden G2 check-point Arrests (Fink et al. 1996). Dieser Zell-Zyklus

check-point erlaubt es den Zellen eine Reparatur, oder bei ausgeprägten Schäden, die Apoptose einzuleiten, ähnlich wie der G2 Arrest mediiert durch TP53 und p21. Die Faktoren, die diese Antwort auf DNA Schäden vermitteln sind nicht genau bekannt, möglicherweise spielt der p34-Cyclin-B Komplex bei diesem Signal eine Rolle (King et al. 1994). Diese Verbindung zwischen dem MMR-Protein-Komplex, der Reparatur von DNA-Schäden und dem G2 Zell-Zyklus check-point zeigt, dass das MMR-System sowohl in Reparatur-Prozesse als auch in die die Zellteilung limitierende Signaltransduktion involviert ist.

Der Verlust bzw. die Verminderung der Aktivität des MMR-Systems kann so zu einer Resistenz gegenüber einer Reihe von verschiedenen zytostatischen Substanzklassen führen. Die Resistenz gegenüber alkylierenden Agentien konnte häufig beobachtet werden (Liu et al. 1996, Friedmann et al. 1997, Dosch et al. 1998, Shin et al. 1998). Alkylierende Substanzen wie die Nitrosoharnstoffderivate, Procarbazin und Temozolomid (Temodal) führen zur Bildung von O-Methyl-Guanin Addukten, mit denen bei der Replikation fälschlicherweise ein Thymin gepaart wird. Dieses Mismatch wird durch das MMR-System erkannt, der neu synthetisierte, das Thymin tragende Strang wird ausgeschnitten und meist wieder mit einem Thymin in der entsprechenden Lokalisation neu synthetisiert. Nach zahlreichen solcher frustrierten Reparaturversuche steigt das Risiko für die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen, die dann schließlich die Apoptose induzieren. Andere alkylierende Medikamente, so auch BCNU, Melphalan und Perfosfamid, die biologisch aktive Form des Cyclophosphamid, werden möglicherweise nicht vom MMR-System erkannt, Resistenzen auf diese Medikamente können so auch anders bedingt sein (Liu et al. 1996, Aebi et al. 1997). Dazu gibt es aber auch andere Daten, die Gegenteiliges zeigen (Friedman et al. 1997). Tumorzellen können sich durch Reduktion der MMR Aktivität gegen Antimetabolite wie das 6-Thioguanin und die Mercaptopurine schützen (Swann et al. 1996, Dosch et al. 1998). Diese Medikamente werden von der Zelle in 2-Deoxy-6-Thioguanin Triphosphate konvertiert, welche nach Inkorporation in das Genom durch S-Adenosylmethionin methyliert werden und S-Methylthioguanine bilden. Diese werden nur schlecht von der O-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) erkannt und können

Fehlpaarungen mit Thymin eingehen, die wiederum durch den hMSH2-hMSH6 Proteinkomplex erkannt werden (Swann et al. 1996, Waters und Swann 1997). Wahrscheinlich spielen noch weitere zytotoxische Effekte der Antimetabolite eine Rolle, die ebenfalls durch MMR erkannt werden (Fink et al. 1998). Defekte der Mismatch-Reparatur können so auch zu Resistenzen gegenüber Antimetaboliten führen.

Die Platin enthaltenden Zytostatika Cisplatin und Carboplatin führen zu DNA-Schäden, die ebenfalls durch den MutS-alpha Komplex bestehend aus hMSH2 und hMSH6 Proteinen erkannt werden. So konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass Defekte im MMR-System auch zu Resistenzen gegenüber diesen Platinverbindungen führen können (Aebi et al. 1996, Drummond et al. 1996, Fink et al. 1996, Lage et al. 1999, Mello et al. 1996, Duckett et al. 1996). Der MutS-beta Komplex aus hMSH2 und hMSH3 Proteinen spielt hierbei allerdings keine Rolle (Vaisman et al. 1998). Durch Defekte im MMR-System fehlt die Induktion des programmierten Zelltodes durch Erkennung der DNA-Schäden, was die Tumorzellen auf diese Weise wiederum überleben lässt und damit resistent macht (Nehme et al. 1997, Hawn et al. 1995).

Die außerordentlich lipophilen Anthrazykline wie das Doxorubicin interkalieren in den DNA-Doppelstrang und hemmen die DNA Topoisomerase II nachdem das Enzym einen Doppelstrangbruch katalysiert hat (Corbett et al. 1993). Durch den Verlust der physiologischen Funktion dieses Enzymes führen diese Doppelstrangbrüche schließlich zur Apoptose (Gieseler et al. 1996). Ähnliche Effekte konnten auch bei dem Topoisomerase II aktiven Zytostatikum Etoposid (VM26) gezeigt werden. Dieses Epipodophylotoxin produziert DNA-Doppelstrangbrüche durch Interaktion mit der DNA Topoisomerase II und führt so zur Apoptose (Walker et al. 1991). Interessanterweise zeigten MMR defiziente Zellen Resistenzen gegenüber diesen Topoisomerase II aktiven Medikamenten, wobei der Mechanismus derzeit noch nicht ganz klar ist (Aebi et al. 1997, Lage et al. 1999, Drummond et al. 1996). Möglicherweise dient das MMR-System als Detektor des Komplexes aus Topoisomerase II und DNA Strangbrüchen induziert durch Doxorubicin und Etoposid (Chen und Liu 1994). Ein anderer möglicher Mechanismus wäre, dass MMR Proteine den Strangbruch

induzierenden Komplex aus den genannten Zytostatika und der DNA Topoisomerase II stabilisieren und so den Schaden an der DNA verstärken, bei Verlust der MMR Funktion wäre die Wirkung der Topoisomerase II Hemmer dadurch deutlich vermindert (Fink et al. 1998).

Medikamente, die die Dihydrofolatreduktase hemmen wie Methotrexat, führen zur Inhibition der Thymidylat-Synthese und induzieren so Fehlpaarungen von Nukleotiden in die genomische DNA. Diese Fehlpaarungen können nun auch vom MMR-System erkannt werden und eine recht aktuelle Arbeit konnte zeigen, dass zwar sowohl in MMR profizienten als auch in MMR defizienten Tumorzellen apoptotische Funktion nach Exposition von Methotrexat nachweisbar war, die Tumorzellen mit MMR- Funktion aber nach Methotrexat-Behandlung deutlich weniger vital waren und die Apoptose deutlich effizienter getriggert wurde (Frouin et al. 2001).

Zusammenfassend erkennt man, dass der Verlust oder aber auch die verminderte Funktion des Mismatch-Reparatur-Systems zu Chemoresistenzen gegen zahlreiche, in der klinischen Praxis verwendete Substanzen führt. Eine Arbeitsgruppe konnte allerdings auch zeigen, dass verschiedene Zelllinien, die eine vermindert MMR-Funktion aufwiesen, deutlich sensitiver gegenüber dem Nitrosoharnstoffderivat CCNU reagierten (Aquilina et al. 1998). Möglicherweise spielt bei manchen Tumoren also nicht nur die apoptotische Funktion des Systems, sondern auch die Reparaturkapazität der MMR-Proteine eine Rolle bei der Resistenzentwicklung.

In einem weiteren einleitenden Abschnitt soll nun auf die Verbindung des MMR-Systems mit apoptotischen Signalwegen, vor allem mit *TP53*, eingegangen werden.

#### 1.4 *TP53* in malignen Gliomen

Das *TP53* Genprodukt wurde 1979 unabhängig voneinander von drei Arbeitsgruppen entdeckt. Zwei der Gruppen konnten zeigen, dass Antikörper gegen ein DNA Tumorvirus-Genprodukt auch ein 53kD Protein offensichtlich

zellulären Ursprungs präzipitierten (Lane und Crawford 1979, Linzer und Levine 1979). In einem weiteren Ansatz konnte gezeigt werden, dass Immunsereen von Tieren mit verschiedenen Tumoren mit einem zellulären 53kD Protein in Tumorzellen deutlich stärker reagierten als in normalen Zellen (DeLeo et al. 1979). 1985 wurde die cDNA von *TP53* kloniert (Harlow et al. 1985), und verschiedene Studien konnten dann mit *TP53* eine maligne Transformation von Zellen *in vitro*, vor allem in Kombination mit anderen Onkoproteinen wie *ras*, nachweisen (Jenkins et al. 1984, Rovinski und Benchimol 1988). Dies führte zu der Annahme, dass *TP53* ein dominantes Protoonkogen ist. Später konnte dann auch die Rolle von *TP53* in der natürlichen Tumorigenese nachgewiesen werden, indem in Leukämien sowohl bei Mäusen (Ben David et al. 1988) als auch bei Menschen (Prokocimer et al. 1986) und auch in humanen osteogenen Sarkomen (Masuda et al. 1987) *TP53* Veränderungen gefunden wurden. Bei diesen Veränderungen handelte es sich vor allem um größere Deletionen und größere Fehlanordnungen im *TP53* Gen-Lokus, so dass eine Zunahme an *TP53* Funktion entsprechend eines dominanten Protoonkogens unwahrscheinlich wurde. Dieses Paradoxon klärte sich, als gezeigt wurde, dass das ursprünglich klonierte und für Transformationsstudien eingesetzte *TP53* mutiert war und nicht dem Wild-Typ entsprach. Später wurde dann der Verlust von *TP53* Wild-Typ in zahlreichen Tumoren nachgewiesen, so dass es heute als Tumor-Suppressor Gen gilt (Baker et al. 1989, Marshall et al. 1991, Bögl er et al. 1995).

Eine Hauptfunktion des *TP53* Proteins ist das Anhalten des Zell-Zyklus in der G1-Phase und damit das Verhindern der Progression in die S-Phase nach DNA-Schädigung. Hierdurch wird der Zelle die Möglichkeit zur Reparatur dieser Schäden gegeben und eine Akkumulation von Mutationen und damit die Gefahr einer malignen Transformation wird vermindert (Kastan et al. 1991, Kuerbitz et al. 1992). Daneben spielt *TP53* auch bei der Seneszenz, das heißt der Zell-Zyklus bzw. Proliferationskontrolle, unabhängig von DNA Schäden eine Rolle (Bond et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Gamma- als auch UV-Strahlung *TP53* induziert (Kastan et al. 1991, Maltzman und Czyzy 1984), aber auch bestimmte Medikamente zeigten eine *TP53* induzierende Wirkung (Yin et al. 1992). Ein wichtiger Signalweg, über

das das TP53 Protein den Zell-Zyklus arretiert, ist die Induktion von p21, ein Protein, auch bekannt als Waf1 oder Cip1 Protein, welches über die Inhibition von CDK (*Cyclin Dependent Kinase*, Zyklin abhängige Kinase) – Cyclin-Komplexen den Zell-Zyklus und die Proliferation aufhält (El-Deiry et al. 1994, Harper et al. 1993). Ein weiterer wichtiger Signalweg, über den TP53 die Zellproliferation und DNA Reparatur regelt, ist das GADD45 Gen (Growth-Arrest-and-DNA-Damage-inducible) (Kastan et al. 1992, Chen et al. 1994). GADD45 wird nach DNA Schaden TP53 abhängig induziert, führt zu einem Proliferationsstop und aktiviert PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Kastan et al. 1992, Sancar et al. 1994). Die Assoziation von GADD45 und PCNA führte zur direkten Stimulation von Reparatur *in vitro* (Smith et al. 1994). Neben den Zell-Zyklus-Arrest -und Reparatur-Induktions-Funktionen ist das TP53 Protein allerdings auch ein potenter Apoptose-Induktor unter anderem nach Exposition mit Zytostatika (Lowe et al. 1993). So konnte gezeigt werden, dass das Ansprechen von experimentellen Tumoren auf Gamma-Strahlen und Adriamycin vom TP53 Status abhängig war (Lowe et al. 1994).

Der Verlust eines Alleles von Chromosom 17p und TP53 Mutationen werden in niedriggradigen Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen und den sekundären Glioblastomen mit etwa gleicher Häufigkeit von etwa 40-50% gesehen (Louis et al. 1994). Dies zeigt, dass der TP53 Wild-Typ Verlust offensichtlich ein frühes Ereignis in der Gliom-Entstehung ist. Die TP53 Mutationen in humanen Gliomen sind meist Missense-Mutationen und betreffen vor allem die Exone 5, 7 und 8 (Louis et al. 1993). Ein weiterer Hinweis, dass TP53 bei der Gliomgenese eine Rolle spielt, ist die Tatsache, dass Patienten mit einer Keimzell-Mutation von TP53, auch als Li-Fraumeni-Syndrom bezeichnet, ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung glialer Tumoren haben (Malkin et al. 1990). Niedriggradige Astrozytome zeigen charakteristischerweise eine geringe mitotische Aktivität, aber auch eine hohe Rate an weiterer maligner Transformation. Beides könnte die Inaktivierung von TP53 Protein reflektieren, welche typischerweise zu genomischer Instabilität führt. Diese Instabilität bedingt die Ansammlung weiterer Mutationen, welche dann schließlich zur Transformation in ein sekundäres Glioblastom führt (Maher et al. 2001).

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Ein Hauptproblem bei der heute angewendeten Chemotherapie von Glioblastomen ist, dass nur eine kleine Gruppe von Patienten von einer systemischen Chemotherapie profitiert. Prädiktive Faktoren zur Identifizierung dieser Patientengruppe fehlen bislang. Ein nicht unerheblicher Teil der Glioblastome zeigt sich bereits *in vitro* resistent gegen eine Vielzahl von Chemotherapeutika. Interessanterweise weist ein Teil der Glioblastome eine verminderte Expression von MMR Genen auf, die bereits bei anderen Tumoren mit Zytostatikaresistenzen in Verbindung gebracht wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung dieser differentiellen Expression von MMR-Genen für die Chemoresistenz in Glioblastomen zu untersuchen. Daraus ableitend sollte die Funktion dieser molekularen Veränderungen, auch im Zusammenhang mit genetischen und funktionellen Veränderungen von *TP53*, welches mit dem MMR-System interagiert, als mögliche prädiktive Faktoren der Chemoresistenz bzw. Chemosensitivität erarbeitet werden.

Dazu wurde zunächst untersucht, ob die mRNA-Expression der 5 MMR Gene *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6 (GTBP)*, *hPMS1* und *hPMS2* mit der *in vitro* Resistenz von 25 primären bzw. *de-novo* Glioblastomen korreliert.

Wenn sich Hinweise für eine Korrelation mit der transkriptionellen Expression von MMR Genen ergeben sollten, sollte zusätzlich die Protein-Expression untersucht werden, um die funktionelle Bedeutsamkeit dieser differentiellen mRNA Expression auf Proteinebene zu bestätigen.

Das MMR System interagiert bzw. aktiviert *TP53* Protein abhängige apoptotische Signalwege. Das *TP53* ist in astroglialen Tumoren häufig genetisch, aber auch häufig funktionell alteriert. Aus diesem Grund sollte zusätzlich der *TP53* Status, d.h. Mutationen und *TP53* Protein-Stabilisierungen, untersucht und mit der MMR Gen-Expression in Zusammenhang gebracht werden.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Geräte

Alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden -soweit nicht anders im Text vermerkt- von der Firma Boehringer, Ingelheim, Deutschland bezogen.

Sterile Plastikwaren für die Zellkultur stammten von der Firma Falcon, New Jersey, NJ, USA und die Zellkultur-Medien und -Seren von der Firma Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland.

Taq-DNA-Polymerase und DNA/RNA-Isolations-Kits wurden bei Firma Quiagen, Hilden, Deutschland erworben. Hexanukleotid-Primer, Moloney-Murine-Leukemia-Virus (M-MLV) Reverse Transkriptase, 2' Deoxynukleosid 5' Triphosphate (dNTPs) und die DNA- und Protein-Größenmarker kamen von Firma Boehringer, Mannheim, Deutschland.

Alle Reagenzien für die Bradford-Protein-Assays wurden von Firma Biorad, München, Deutschland bezogen, die Röntgenfilme X-AR kamen von Eastman Kodak, Rochester, USA und die Polyvinylidon-Difluorid (PVDF) Immobilion-Membranen für die Western-Blot-Analysen von Firma Millipore, Bedford, MA, USA. Die Agarose wurde bei Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland erworben.

Die Tumorzellen wurden in einem Stericult 200 Inkubator, Firma Heraeus, kultiviert, die PCR-Reaktionen fanden in einem PTC-100 Thermocycler von MJ-Research Inc., Waterston, Mass., USA statt. Gelelektrophoresekammern stammten von Biorad, Hercules, CA, USA und die Power-Units von Pharmacia CKB, Freiburg, Deutschland.

### 3.1.2 Puffer und Lösungen

Die in **Tabelle 1** aufgeführten Puffer und Lösungen wurden benutzt.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
TE (pH 8.0)	10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)
TBE	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,2 mM EDTA
PBS (pH 7.4)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
TBS	20 mM Tris (pH 7,5), 138mM NaCl
TTBS	20 mM Tris (pH 7,5), 138mM NaCl, 0,1% Tween 20l
DNA Ladepuffer	95% Formid, 10 mM NaOH, 0,05% Bromphenol Blau, 0,05% Xylen- Cyanol
SDS Ladepuffer	62,5 mM Tris-Cl (pH 6,8), 2% SDS, 10% Glycerol, 50 mM DTT, 0,1% Bromphenol Blau
SDS Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS
Protein Lysepuffer	20mM Tris-Cl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2,5 mM Natrium Pyrophosphat, 1 mM β-Glycerolphosphat, 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin,
DHPLC Puffer A	0,1 M Triethylammonium-Azetat (TEAA), 0,025% Azetonitril
DHPLC Puffer B	0,1 M Triethylammonium-Azetat (TEAA), 25% Azetonitril

**Tabelle 1:** Puffer und Lösungen

### 3.1.3. Oligonukleotide

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Oligonukleotide wurden in den MMR RT-PCR-Analysen bei spezifischen Anlagerungstemperaturen benutzt. Alle Primer wurden bei der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland hergestellt.

Primer	Oligonukleotidsequenzen
β-Actin sense antisense	5'-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3' 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'
hMSH2 sense antisense	5'-GTCGGCTTCGTGCGCTTCTTT-3' 5'-TCTCTGGCCATCAACTGCGGA-3'
hMLH1 sense antisense	5'-GTGCTGGCAATCAAGGGACCC-3' 5'-CACGGTTGAGGCATTGGGTAG-3'
hPMS1 sense antisense	5'-GCGGCAACAGTTCGACTCCTT-3' 5'-AGCCTTGATACCCTCCCCGTT-3'
hPMS2 sense antisense	5'-TGCATGCAGCGGATTTGGAAA-3' 5'-GAACCCCTCAGAATCCACGGA-3'
hMSH6 sense antisense	5'-CCCTCAGCCACCAAAGAAGCA-3' 5'-CTGCCACCACTTCTCATCCC-3'

**Tabelle 2:** Oligonukleotide der MMR RT-PCR

Die in **Tabelle 3** aufgeführten Oligonukleotide wurden für die Amplifikationen der Exone 5-8 des p53 Gens benutzt.

Primer	Oligonukleotidsequenzen
Exon5 sense antisense	5'-ATGTGTTCACTTGTGCCCTG-3' 5'-AACCAGCCCTGTCGTCTCTC-3'
Exon6 sense antisense	5'-AGGGTCCCCAGGCCTCTGAT-3' 5'-CACCCCTAACCCCTCCTCCC-3'
Exon7 sense antisense	5'-CCAAGGCGCACTGGCCTCATC-3' 5'-CAGAGGCTGGGGCACAGCAGG-3'
Exon8 sense antisense	5'-TTCCTTACTGCCTCTTGCTT-3' 5'-TGTCTGCTTGCTTACCTCG-3'

**Tabelle 3:** Oligonukleotide der p53 PCR-Amplifikationen, Exon 5-8.

#### 3.1.4. Antikörper

Für die hMSH2 Western Blot Analysen und die hMSH2 Immunhistochemie wurden monoklonale Antikörper gegen das Carboxy-Terminale Fragment von dem humanen MSH2 Protein, Klon FE11, Fa. Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA, in Verdünnungen von 1:1000 in TTBS-Puffer (Western Blot) bzw. 1:200 (Immunhistochemie) benutzt.

Für die TP53 Western Blot Analysen wurden Antikörper gegen das TP53 Protein, Klon D0-7, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland, in einer Verdünnung von 1:1000 in TTBS-Puffer benutzt.

#### 3.1.5. Glioblastome

Es wurde Tumor-Material von 25 Patienten mit primären Glioblastomen, die zwischen 1998 und 2000 operiert wurden, verwendet. Die Patienten waren bei Diagnose-Stellung in einem Alter zwischen 29 und 77 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 58 Jahren. Das Geschlechterverhältnis lag bei 1,7 männlichen Patienten auf 1 weibliche Patientin.

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Tumorzell-Kultivierung

Tumorgewebe von nicht-nekrotischen Tumorarealen von 25 Glioblastomen wurde bereits intraoperativ in RPMI 1640 Medium (Fa. Gibco) überführt. Das Medium enthielt 10% fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS), 20 U/ml Penicillin und 20µg/ml Streptomycin. Das Gewebe wurde nach einer zweistündigen Inkubationszeit mit 10ml/g Gewebeskollagenase (14%) und DNase (0,01%) der Fa. Sigma, Deutschland, zerstückelt, zweimalig mit HBSS gewaschen und in RPMI 1640 Medium (10% FCS, 20U/ml Penicillin und 20µg/ml Streptomycin) resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden dann in Plastik-Kulturflaschen, 75cm<sup>2</sup> der Fa. Falcon, bei 37°C, 5% CO<sup>2</sup> und

93% Luftfeuchte inkubiert. Um toxische Tumorprodukte zu entfernen, wurde das Medium täglich gewechselt.

### 3.2.2 Chemosensitivitäts-Testung

Der MTT Test (Methyl-Thiazol-Tetrazolium Test) wurde von Nikkhah und Mitarbeitern 1993 für Hirntumorsensitivitätstestungen optimiert. Die kultivierten Tumorzellen wurden mit Zytostatikalösungen von ACNU, BCNU, CCNU, Mitoxantron oder Teniposid (VM 26) für eine Stunde, von Cisplatin für 4 Stunden oder von Cytosin-Arabinosid, Methotrexat, Taxol, Temodal oder Vincristin kontinuierlich inkubiert. ACNU und Cisplatin wurden von der Fa. Asta, Frankfurt, bezogen, Cytosin-Arabinosid wurde von Fa. Cell-Pharm, Hannover, Mitoxantron von Fa. AWD, Dresden, BCNU, CCNU, Taxol, Vincristin und VM26 von der Fa. Bristol-Myers Squibb, New York, USA, Methotrexat von der Fa. Rhone-Poulonc, Frankfurt, und Temodal von der Fa. Essex, München, bezogen. Die Konzentrationen der getesteten Medikamente sind in **Tabelle 4** aufgeführt.

Zytostatika	Eingesetzt Konzentrationen
ACNU	5 µg/ml
BCNU	5 µg/ml
Cytosin-Arabinosid	20 µg/ml
CCNU	20 µg/ml
Cisplatin	4 µg/ml
Mitoxantron	0,35 µg/ml
Methotrexat	0,1 µg/ml
Taxol	0,1 µg/ml
Temodal	5 µg/ml
Vincristin	0,01 µg/ml
VM 26	10 µg/ml

**Tabelle 4:** Konzentrationen der eingesetzten Zytostatika

Die Tumorzellen wurden nach der Inkubation mit PBS gewaschen und in einer Konzentration von 6000 Zellen pro Well auf eine 96-Well Mikrotiterplatte in jeweils 300µl Medium überführt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 7 Tagen, bei 37°C, 5% CO<sup>2</sup> und 93% Luftfeuchte, wurde der Überstand entfernt und in jedes Well wurden 200µl frisches Medium zusammen mit dem MTT Reagenz (Fa. Sigma, Deutschland) in einer Konzentration von 1mg/ml hinzupipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden so für 4 Stunden inkubiert, danach wurde der Überstand wieder entfernt und in jedes Well wurden 100µl DMSO hineinpipettiert. Die Platten wurden dann für 5 Minuten geschüttelt und die Extinktionwerte der Formazan-Lösung, produziert durch vitale Tumorzellen, wurden durch einen MR 700 Mikrotiterplatten Leser der Fa. Dynatech, Deutschland, bei einer Wellenlänge von 550nm (Referenzwellenlänge 630nm) bestimmt. Diese Werte korrelierten nun mit dem Tumorwachstum nach bzw. unter Behandlung mit den aufgeführten Zytostatika. Die Unterschiede der Absorptionen zwischen Test- und der Referenzwellenlängen wurden bestimmt und die mittlere Vitalität der behandelten Glioblastomzellen wurde mit einer unbehandelten Kontrolle des gleichen Tumors verglichen. Ein Tumor wurde als resistent gegenüber einem Zytostatikum bezeichnet, wenn 50% oder mehr der Tumorzellen trotz Behandlung mit dem Medikament überlebt haben. Durch die lange Inkubationszeit von 7 Tagen (s.o.) wurde nicht nur die Akuttoxizität, sondern auch der antproliferative Effekt der Medikamente miterfasst.

### 3.2.3 Extraktion der Nukleinsäuren

#### 3.2.3.1 Extraktion der RNA

Bei der Isolierung der Ribonukleinsäuren wurde mit gesonderten RNase-freien Materialien und Lösungen gearbeitet. Die RNA wurde aus zu etwa 70% Konfluenz gewachsenen Monolayer-Kulturen aus Petrischalen mit 10cm Durchmesser gewonnen. Die Isolation wurde mit dem RNeasy-Kit der Fa. Quiagen, Hilden, Deutschland modifiziert nach der Guanidinium-Isothiocyanat-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) durchgeführt. Der

beigefügte Lyse-Puffer wurde nach einmaligem Waschen der Monolayer mit PBS-Lösungen direkt auf die Zellen gegeben. Alle anderen Schritte wurden entsprechend des dem Kit beigefügten Protokolls der Fa. Qiagen durchgeführt. Abschließend wurde die RNA in RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Auf einem 5% Agarose-Gel wurde die RNA auf DNA-Kontaminationen untersucht.

#### 3.2.3.2 Extraktion der genomischen DNA

Die genomische DNA wurde aus zu etwa 70% Konfluenz gewachsenen Monolayer-Kulturen aus Petrischalen mit 10cm Durchmesser gewonnen. Die Isolation wurde mit dem QIAamp DNA Mini-Kit der Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland durchgeführt. Dazu wurden die Tumorzellen mit Trypsin von den Petrischalen abgelöst und bei 1200 rpm für 1 Minute abzentrifugiert. Das abzentrifugierte Zell-Pellet wurde zum Waschen zweimal in jeweils 2ml PBS aufgenommen und wieder abzentrifugiert und dann schließlich in 200 $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Zu der Resuspension wurden 20 $\mu\text{l}$  Proteinase K hinzugefügt, alle weiteren Schritte wurden entsprechend des dem Kit beigefügten Protokolls der Fa. Qiagen durchgeführt.

#### 3.2.4 Extraktion der Proteine

Entsprechend dem Standard-Protokoll (Sambrook et al. 1989) wurden die proliferierenden Zellen nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS für 10 Minuten mit Leupeptin als Proteaseinhibitor entaltendem Triton X-100-Lysepuffer auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden anschließend mechanisch mit einem Zell-Schaber von der Petrischale gelöst, der Zelldetritus wurde durch Zentrifugation mit 10.000 Umdrehungen pro Minute (rounds per minute, rpm) für 10 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  entfernt und der Überstand wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.2.5 RT-PCR

#### 3.2.5.1 Synthese der komplementären DNA

Für die Erststrangsynthese der komplementären DNA (cDNA) wurden jeweils 250ng der isolierten Tumor-RNA verwendet. Bei 70°C wurde die RNA für 15 Minuten zunächst denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Danach fand die Anlagerungsreaktion der zufällig generierten Hexamer-Oligonukleotide in einem Reaktionsgemisch mit 50mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM DTT, 250 µM jedes dNTP und 0,5 µl des Hexanukleotidgemisches bei Raumtemperatur in einem Volumen von 20µl statt. Nach Zugabe von 100U M-MLV Reverse Transkriptase fand die Strangverlängerungsreaktion bei 37°C für 120 Minuten statt, die durch anschließende Erhitzung auf 100°C für 5 Minuten beendet wurde.

#### 3.2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion fand in einem Reaktionsgemisch statt, welches 5µl des Erststrangansatzes, 10mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 0,4 U Taq-DNA-Polymerase und entweder *hMSH 2* und *hMLH 1*, *hPMS 1*, *hPMS 2* und *hGTBP* oder *D7S12* ( $\beta$ -Actin) Oligonukleotide in einem Endvolumen von 50µl enthielt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt (94°C, 5 min.) wurden 30 Zyklen bei 59°C Annäherungstemperatur für die MMR Gene und 24 Zyklen bei 61°C Annäherungstemperatur für die  $\beta$ -Actin Kontrolle durchgeführt, gefolgt von einem terminalen Strangverlängerungsschritt von 10 Minuten bei 72°C. Die einzelnen Temperaturzyklen bestanden aus einem Denaturierungsschritt (94°C für 1 min.), einem Annäherungsschritt (59°C bzw. 61°C für 1 min.) und einer Strangverlängerung (72°C für 2 min.).



### 3.2.6 Western Blot Analyse

#### 3.2.6.1 Bradford Assay

Diese Methodik dient der Quantifizierung von Protein und basiert auf dem Prinzip, dass Proteine den Farbstoff Coomassie-Blau binden und damit dessen Absorptionsmaximum von 465nm nach 595nm verschieben. Die Absorption bei Messung mit entsprechender Wellenlänge verhält sich somit proportional zu der vorhandenen Proteinmenge (Bradford 1976). Die Proben wurden vor der Messung zunächst in PBS und in PBS mit 0,01% Triton X-100 1:200 bzw 1:400 verdünnt und danach mit dem Bradford-Reagenz (s. Puffer und Lösungen) versetzt. Anschließend wurde dann bei einer Wellenlänge von 595nm (s.o.) gegen einen Leerwert aus 0,01% Triton X-100 in PBS und Bradford Reagenz gemessen. Aus den erhaltenen Absorptionen wurden dann mit Hilfe der Absorptionen eines bekannten Proteinstandards die Konzentrationen berechnet.

#### 3.2.6.2 SDS-PAGE

Bei der SDS Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine in 5-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 100°C denaturiert. Danach wurden die Proben für 10 Sekunden abzentrifugiert und auf 10% SDS-Polyakrylamid-Gele geladen. Bei 90V Gleichstrom-Spannung wurden die Proteine dann in der vertikalen Mini-Protein-Kammer von Biorad für 1,5h in SDS-Laufpuffer (s.Puffer und Lösungen) elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 3.2.6.3 Western Blot

Im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden die SDS-PAA Gele nach Sambrook (Sambrook 1989) in einem halb-trockenen

(`semi-dry`) System mit drei Puffern (Anodenpuffer 1: 0,3M Tris, 20% Methanol, Anodenpuffer 2: 25mM Tris, 20% Methanol, Kathodenpuffer : 25mM Tris, 40mM  $\epsilon$ -Amino-n-Caprone, 20% Methanol) bei 150mA für eine Stunde auf PVDF-Membranen (Immobilon) geblottet. Nach diesem Transfer der Proteine wurden die Membranen mit fettfreiem Magermilch-Pulver in TTBS für eine Stunde geblockt und anschließend 3mal jeweils für 5 Minuten in TTBS gewaschen. Dann wurden sie für 12 Stunden mit den Primär-Antikörpern gegen humanes MSH2- bzw. humanes TP53 Protein bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubation folgten nochmals 3 Waschschrte für jeweils 5 Minuten in TTBS und danach die Inkubation mit den Sekundär-Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurde die Immunreaktion mit Hilfe einer Chemielumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Die an den Sekundär-Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase setzt das in dem ECL-Reagenz von Amersham gelöste Substrat in einen fluoreszierenden Farbstoff um, was durch Exposition der Membranen gegenüber hochsensiblen Röntgenfilmen wie Kodak X-OMAT MA für 5 Minuten schließlich die Immunreaktion sichtbar machte.

### 3.2.7 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden nach der indirekten Immunperoxidase-Reaktion durchgeführt. Zunächst wurden 6 $\mu$ m Schnitte des in Paraffin eingebetteten Tumorgewebes angefertigt. Diese Schnitte wurden dann zur Antigenwiederaufbereitung in Zitratpuffer, pH 6,0, für 30 Minuten bei 95°C in der Mikrowelle vorbehandelt. Danach wurden die Schnitte mit spezifischen Antikörpern gegen das Carboxy-terminale Fragment des humanen MSH2 Proteins (Klon FE11, Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA) in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Bei den ebenfalls angefertigten Negativ-Kontrollen wurde dieser Primär-Antikörper weggelassen. Als Sekundär-Antikörper diente ein Biotin-konjugierter Pferde-Anti-Maus-IgG Antikörper, mit dem die Schnitte in einer Verdünnung von 10 $\mu$ l in 10ml PBS für 30 Minuten inkubiert wurden. Zur

Detektion wurde Avidin-Biotin-Meerrettich Peroxidase benutzt, wodurch die Immunreaktion mit dem Substrat 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) in einer Konzentration von 5 mg/ml in 0,05 M Tris-Puffer, pH 7,6, bei 15 Minuten Inkubationszeit sichtbar gemacht wurde. Die Schnitte wurden dann im Anschluss mit Mayer's Haemalaun gegengefärbt.

### 3.2.8 *TP53* Mutationsanalyse

#### 3.2.8.1 PCR Amplifikationen

Die Polymerase-Kettenreaktionen fanden in 50µl Reaktionsgemischen statt, welche 4µl der genomischen DNA (entsprach 50-200ng DNA), 10mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Exon 6 und 7) bzw. 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Exon 5 und 8), 200 mM dNTP, 0,4 U Taq-DNA-Polymerase und jeweils 0,4 mM spezifische Oligonukleotide von Exon 5, Exon 6, Exon 7 oder Exon 8 enthielten. Nach einem initialen Denaturierungsschritt (94°C, 4 min.) wurden 40 Zyklen bei 60°C Annäherungstemperatur für Exon 5, 62°C für Exon 6, 65°C für Exon 7 und 56°C für Exon 8 durchgeführt, gefolgt von einem terminalen Strangverlängerungsschritt von 10 Minuten bei 72°C. Die einzelnen Temperaturzyklen bestanden aus einem Denaturierungsschritt (94°C für 30 sek.), einem Annäherungsschritt (60°C, 62°C, 65°C oder 56°C für 30 sek.) und einer terminalen Strangverlängerung (72°C für 30 sek.). Die spezifischen Fragmente wurden schließlich auf 2% Agarose Gelen sichtbar gemacht.

#### 3.2.8.2 Denaturierende Hoch-Druck Flüssigkeitschromatographie (DHPLC)

Die Mutationsanalyse wurde entsprechend der Methode von O'Donovan und Oefner (1998) mit einem automatischen DHPLC Analyse System (Transgenomic, Omaha, USA) durchgeführt. Zu den PCR Amplifikaten der 18 Glioblastome wurden in einem Verhältnis von etwa 1:3 PCR Amplifikate von Wild-Typ *TP53* zu den entsprechenden Exonen hinzupipettiert, um sicher zu

stellen, daß auch Mutationen in beiden *TP53* Allelen durch Heteroduplex-Formation detektiert wurden. Diese PCR Produkt-Gemische wurden dann nach initialer Denaturierung bei 94°C für 4 min. schrittweise um ein 1°C pro Minute bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Die PCR Amplifikate wurden auf eine vorgeheizte Umkehrphasen-Chromatographiesäule (DNA-Sep®, Transgenomic, Omaha, USA) aufgeladen. Das Auswaschen der DNA fand entlang eines linearen Azetonitril Gradienten der DHPLC Puffer A und B (siehe Abschnitt Puffer und Lösungen) statt. Die Analysetemperatur der Chromatographie-Säule jedes PCR Amplifikates entsprach der Temperatur, bei der 75% der DNA als alpha-Helix vorlag bzw. 1-2°C höher. In **Tabelle 5** sind die DHPLC-Bedingungen für die einzelnen Exons aufgeführt.

Exon	Temperatur (°C)	Azetonitril-Gradient (% Puffer B)
5	62	50-63
	65	48-60
	67	48-59
6	61	48-61
7	64	47-59
8	59	49-61
	62	47-59
	64	45-57

**Tabelle 5:** DHPLC-Bedingungen für die Exone 5-8 des p53 Genes.

Die mit der DHPLC detektierten mutierten Exons wurden zur genaueren Charakterisierung der Mutationen im Anschluss direkt sequenziert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Chemosensitivitäts-Testung

Das Tumorgewebe von 22 Glioblastomen wurde wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben als Monolayer für maximal 3 Passagen kultiviert. Die Tumorzellen wurden durch Inkubation mit Trypsin abgelöst und mit den Medikamenten inkubiert. **Tabelle 4** zeigt die Medikamente mit dazugehörigen cut-off Konzentrationen. Nach medikamentenfreier Inkubation für 7 Tage, MTT Inkubation für 4 Stunden und Zugabe von DMSO wurden die Absorptionen aller 22 Tumorzellpassagen bei einer Wellenlänge von 550nm und 690nm gemessen. Die Absorption korreliert nun mit der Menge vitaler Tumorzellen, wobei durch die lange medikamentenfreie Inkubationszeit von 7 Tagen sowohl die direkten zytotoxischen als auch die antiproliferativen Effekte erfasst wurden.

Als Ergebnis wurde sowohl der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zu den eingesetzten 6000 Zellen pro well einer 96-well-Platte erfasst als auch ein Sensitivitäts-Index (SI) erstellt. Dieser ergab sich aus dem Verhältnis der AUC (Area Under the Curve) der behandelten Zellen zu der AUC der mitgeführten Kontrollen ohne Behandlung. Ein Tumor bzw. eine Tumorzell-Passage galt dann als resistent *in vitro*, wenn der SI über 0.5 lag.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der Chemoresistenz-Testung in **Tabelle 6** dargestellt und werden im folgenden kurz beschrieben.

Alle getesteten Tumoren zeigten Resistenzen gegen die Nitrosoharnstoff-Verbindungen ACNU und BCNU. Jeweils ein Gliom zeigte sich noch empfindlich gegen Cisplatin (Zellkultur Nr. 654) und Methotrexat (Zellkultur Nr. 670). Zwölf der 25 untersuchten Tumore (48%) zeigten sich resistent gegenüber Cytosin-Arabinosid, 18 von 25 Gliomen (72%) waren resistent gegenüber Mitoxantron, 10 von 25 Tumoren (40%) zeigten Resistenzen gegen Vincristin, 14 von 25 Tumore (56%) gegen Teniposid und 10 von 25 Tumoren (45%) gegen Taxol, soweit Daten verfügbar waren. Die *in vitro* effektivsten chemotherapeutischen Medikamente waren somit Zytosin-Arabinosid, Vincristin, Teniposid, Taxol und auch Mitoxantron, die

Nitrosoharnstoff-Derivate ACNU und BCNU und das Cisplatin dagegen zeigten sich *in vitro* praktisch nicht wirksam.

Insgesamt wurden so 9 von 25 Glioblastomen (36%) als resistent gegenüber allen eingesetzten Zytostatika getestet, ein Tumor (Zellkultur Nr. 765) zeigte sich lediglich sensitiv gegenüber Vincristin. Diese 10 Gliome wurden von uns als `multi-resistent` bezeichnet. Im Gegensatz dazu zeigten sich 15 der 25 Tumore (60%) sensitiv gegenüber mindestens 3 der eingesetzten zytostatischen Substanzen, diese Gliome wurden daher von uns als `sensitiv` bezeichnet.

Zellkult. Nr.	Zytostatika								
	ACNU	Zytosin-Arabinosid	BCNU	Cisplatin	Mitoxantron	Methotrexat	Vincristin	Teniposid	Taxol
573	R	R	R	R	R	R	R	R	R
588	R	R	R	R	R	R	R	R	R
635	R	R	R	R	R	R	R	R	R
650	R	R	R	R	R	R	R	R	R
685	R	R	R	R	R	R	R	R	R
732	R	R	R	R	R	R	R	R	R
735	R	R	R	R	R	R	R	R	R
765	R	R	R	R	R	R	<b>SEN</b>	R	R
819	R	R	R	R	R	R	R	R	R
822	R	R	R	R	R	R	R	R	R
636	R	<b>SEN</b>	R	R	R	R	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>	-
654	R	<b>SEN</b>	R	<b>SEN</b>	R	R	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>	-
670	R	<b>SEN</b>	R	R	R	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>
677	R	<b>SEN</b>	R	R	R	R	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>	-
693	R	<b>SEN</b>	R	R	<b>SEN</b>	R	<b>SEN</b>	R	<b>SEN</b>
704	R	<b>SEN</b>	R	R	<b>SEN</b>	R	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>
722	R	<b>SEN</b>	R	R	<b>SEN</b>	R	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>
723	R	<b>SEN</b>	R	R	<b>SEN</b>	R	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>
727	R	<b>SEN</b>	R	R	<b>SEN</b>	R	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>
731	R	<b>SEN</b>	R	R	R	R	<b>SEN</b>	R	<b>SEN</b>
761	R	<b>SEN</b>	R	R	R	R	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>
766	R	<b>SEN</b>	R	R	R	R	<b>SEN</b>	R	<b>SEN</b>
767	R	<b>SEN</b>	R	R	R	R	<b>SEN</b>	R	<b>SEN</b>
768	R	<b>SEN</b>	R	R	<b>SEN</b>	R	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>
821	R	R	R	R	<b>SEN</b>	R	R	<b>SEN</b>	<b>SEN</b>

R = resistent    **SEN** = sensitiv    - = keine Daten vorhanden

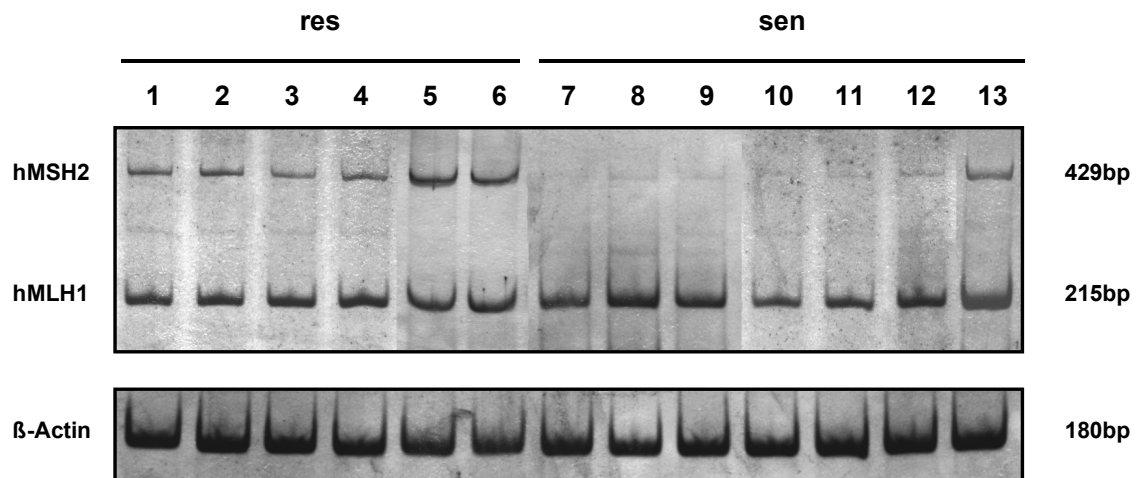
**Tabelle 6:** *in vitro* Chemoresistenztestung der 25 Glioblastome.

## 4.2 RT-PCR

Die 5 Mismatch-Reparatur Gene wurden in zwei Reaktionen der RT-PCR untersucht. In einer ersten Reaktion wurden die Gene *hMSH2* und *hMLH1*, in einer zweiten Reaktion die Gene *hPMS1*, *hPMS2* und *hMSH6* amplifiziert. In einer dritten RT-PCR-Reaktion wurde zur Expressionskontrolle das Haushalts-Gen  *$\beta$ -Actin* untersucht.

Die Amplifikate der 3 Reaktionen wurden dann auf 10 prozentigen PAA-Gelen aufgetragen. Um die Daten übersichtlich darzustellen, sind sie entsprechend den Ergebnissen der Chemosensitivitäts-Testung geordnet. Da die Chemoresistenz-Daten aber zum Zeitpunkt der RT-PCR nicht bekannt waren, befinden sich auf den Gelen Amplifikate sowohl resistenter als auch sensitiv getesteter Glioblastome. Beispielhaft werden einige der angefertigten PAA-Gele in **Abbildung 2** und **3** gezeigt. Die PAA Gele wurden ausschnittsweise aneinandergereiht, so dass jeweils die resistenten bzw. die sensitiven Tumore nebeneinander dargestellt sind. Hierdurch wird ein übersichtlicher Vergleich mit den Chemoresistenz-Daten möglich. In **Abbildung 2** sind auf einem Gel die Banden von *hMSH2* (oben, 429 bp) und *hMLH1* (unten, 215 bp) zu sehen, darunter auf einem zusätzlichen Gel die Banden der  *$\beta$ -Actin* Transkriptionskontrolle (180 bp). Bande Nr.1 entspricht der Lymphozyten-Normal DNA. Die folgenden 5 aufgetragenen Gliome entsprechen den Zellkultur Nummern 735, 732, 685, 822 und 819 in Tabelle 6 und sind multi-resistent, die nachfolgenden sensitiv getesteten Tumore 7-13 in **Abbildung 2** entsprechen den Zellkultur Nummern 723, 766, 704, 636, 677 und 654 in Tabelle 6. Die Amplifikate der Transkriptionskontrolle  *$\beta$ -Actin* stellten sich in allen 13 beispielhaft dargestellten Fällen einschließlich der Lymphozyten-Normal-DNA sehr gleichmäßig dar, dies zeigt, dass gleichmäßige Mengen an RNA eingesetzt wurden. Ebenfalls recht gleichmäßig zeigten sich die Amplifikate von *hMLH1* in allen Proben, im Gegensatz dazu allerdings erkennt man beim *hMSH2* deutliche Unterschiede. Sowohl die Lymphozyten als auch die ersten 5 resistenten Gliome demonstrierten deutliche *hMSH2* Banden, während von den folgenden 7 sensitiven Tumoren lediglich einer ein deutliches *hMSH2*

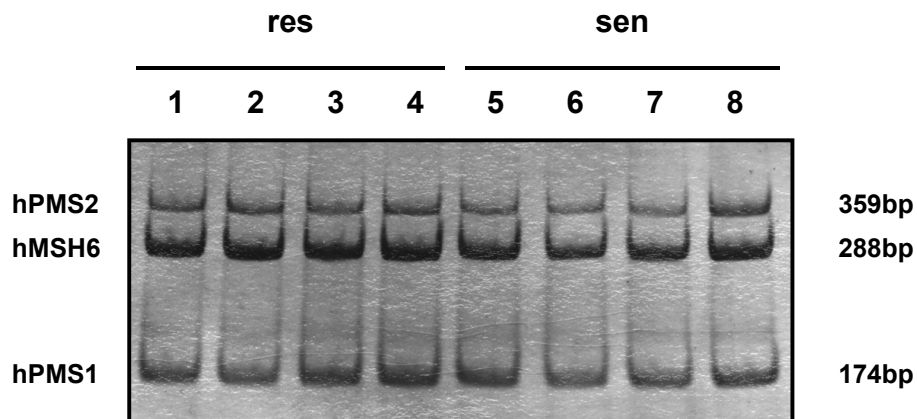
Amplifikat aufwies, bei den anderen 6 Gliomen zeigten sich allenfalls außerordentlich schwache Banden.



**Abbildung 2:** PAA Gele mit spezifischen Amplifikaten von *hMSH2*, *hMLH1* und *β-Actin* von 12 beispielhaft dargestellten Gliomen und von Blut-Lymphozyten. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Chemoresistenz-Daten sind die PAA Gele ausschnittsweise aneinandergereiht dargestellt. (res = resistent, sen = sensibel)

In **Abbildung 3** sind auf einem dritten Gel die Banden von *hPMS2* (oben, 359bp), *hMSH6* (in der Mitte, 288 bp) und *hPMS1* (unten, 174 bp) dargestellt. Die ersten 4 aufgetragenen Tumoren entsprechen den Zellkultur Nummern 765, 735, 732 und 685 in Tabelle 6 und sind multi-resistent getestete Gliome. Die folgenden 4 sensitiven Tumoren entsprechen den Zellkultur-Nummern 636, 677, 654 und 722 in Tabelle 6. Alle 8 beispielhaft dargestellten Tumore zeigten recht gleichmäßig die spezifischen PCR-Amplifikate sowohl von *hPMS1* als auch von *hPMS2* und *hMSH6*. Ebenfalls zeigten die Amplifikate der Blutlymphozyten DNA eine vergleichbare Expression dieser 3 Gene. Die entsprechende Transkriptionskontrolle *β-Actin* dieser Tumore wurde bereits oben in **Abbildung 2** dargestellt.





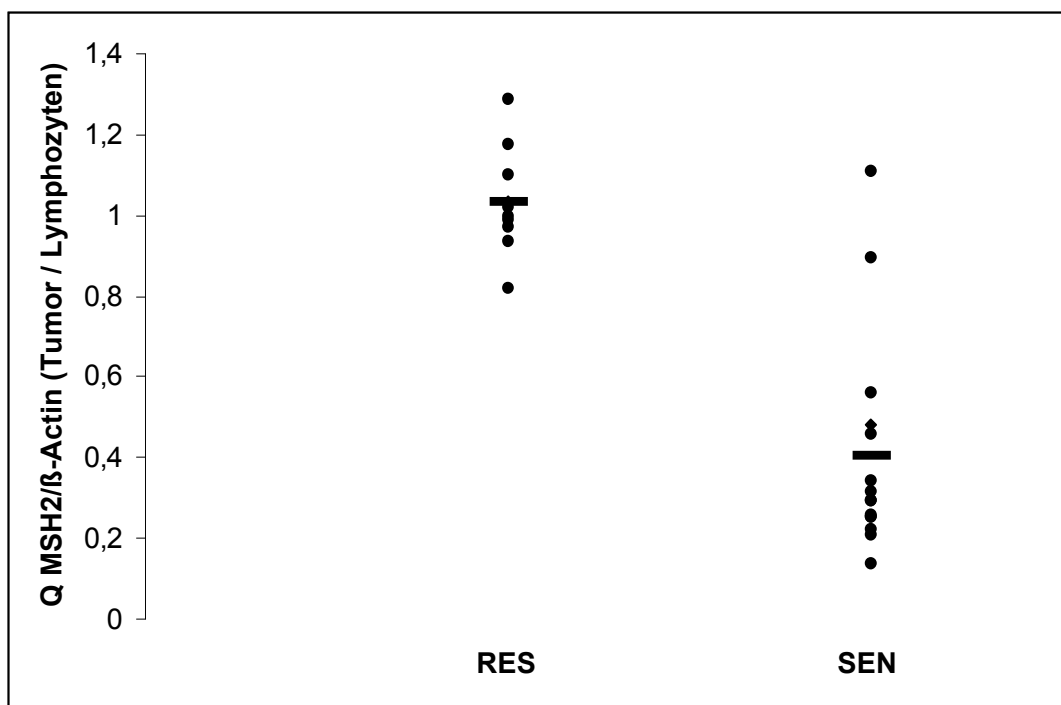
**Abbildung 3:** PAA Gel mit spezifischen PCR Produkten von *hPMS1*, *hPMS2* und *hMSH6* von 8 beispielhaft dargestellten Glioblastomen. (res = resistent, sen = sensibel)

Zur Gesamtdarstellung der RT-PCR Ergebnisse aller 25 Glioblastome sind die PAA-Gele eingescannt und die spezifischen PCR-Amplifikate densitrometrisch bestimmt worden. Aus den densitrometrischen Intensitäten der jeweiligen Mismatch-Reparatur Gen-Amplifikate wurde dann zum Vergleich mit einer endogenen Haushalts-Kontrolle mit der Intensität des zugehörigen *β-Actin* Amplifikates ein Quotient gebildet. Der entsprechende Quotient der lymphozytären Normal-DNA wurde gleich 1,00 gesetzt, die Quotienten der 25 Glioblastome wurden dann mit der Normal-DNA ins Verhältnis gebracht. Ein Wert über 1,00 entsprach somit einer stärkeren Expression, ein Wert unter 1,00 entsprach einer schwächeren Expression im Vergleich zur Lymphozyten-Normal-DNA. Die so erhaltenen Werte der semiquantitativen PCR konnten übersichtlich dargestellt und statistischen Berechnungen zugänglich gemacht werden. In den folgenden **Abbildungen 4-8** sind diese Quotienten in Form von Punkt-Wolken (‘Dot-Blot’) dargestellt. Die schwarzen Balken entsprechen den Mittelwerten.

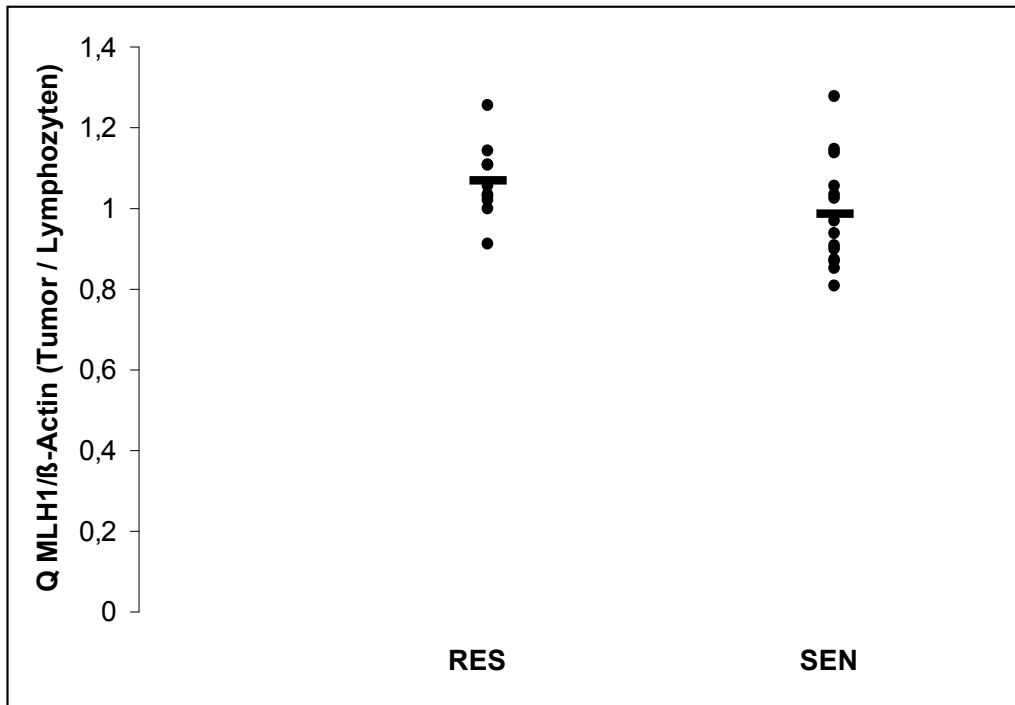
In **Abbildung 4** sind die densitrometrisch evaluierten Intensitäten der *hMSH2* Amplifikate aufgetragen. Man erkennt, dass alle 10 resistent getesteten Gliome deutliche *hMSH2* Banden aufwiesen, die *hMSH2/β-Actin* Quotienten

lagen zwischen 0,82 und 1,29. Bei den sensitiven Tumoren hingegen zeigten 13 von 15 (86%) lediglich schwache *hMSH2* Amplifikate mit densitrometrischen Quotienten unter 0,6. Nur zwei der sensitiv getesteten Gliome zeigten ebenfalls stärkere *hMSH2* Expressionen mit Quotienten von 0,89 bzw. 1,11. Die Mittelwerte der densitrometrischen Quotienten lagen bei 1,03 in der Gruppe der multi-resistenten und bei 0,41 in der Gruppe der sensitiven Glioblastome, im U-Test nach Mann-Whitney zeigte sich so eine hochsignifikant niedrigere *hMSH2* mRNA-Expression bei den sensitiven Tumoren ( $p < 0,01$ ).

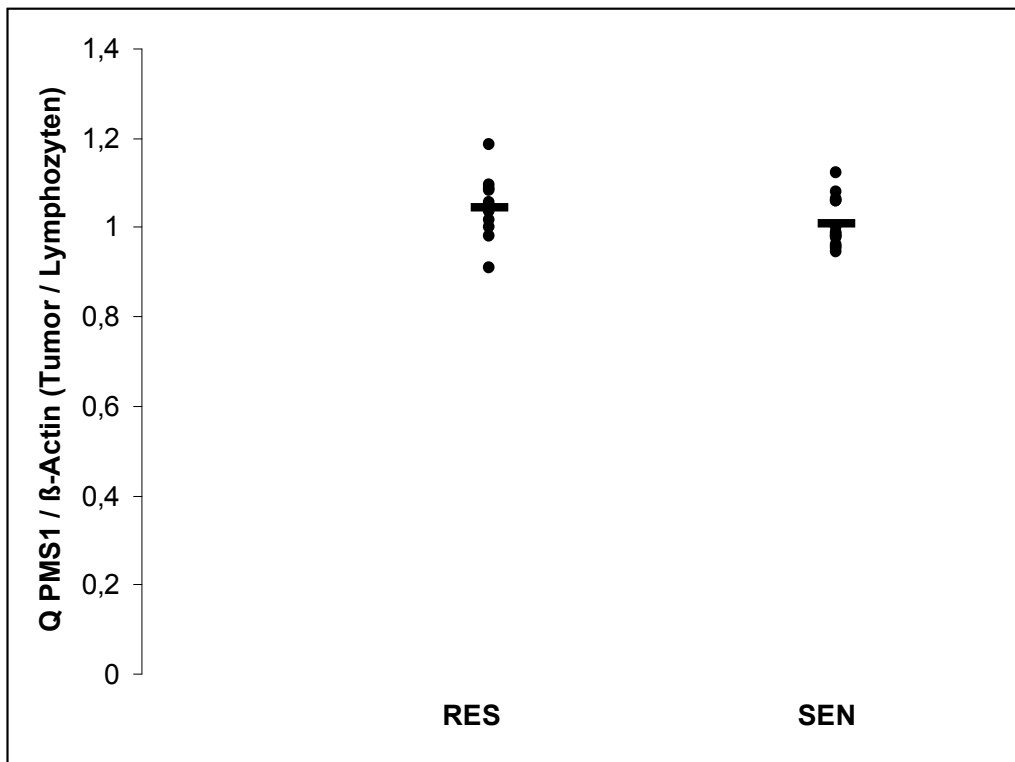
Im Gegensatz dazu fanden sich bei den anderen 4 MMR-Genen keine signifikanten Unterschiede. Die mittleren Densitometrie-Quotienten betragen von *hMLH1* 1,07 bei den resistenten und 0,98 bei den sensitiven Gliomen, von *hPMS1* 1,05 bei den resistenten und 1,01 bei den sensitiven Tumoren, von *hPMS2* 1,03 bei den resistenten und 0,96 bei den sensitiven Glioblastomen und schließlich von *hMSH6* 1,04 bei den resistenten und 0,97 bei den sensitiven Tumoren (**Abbildung 5-8**).



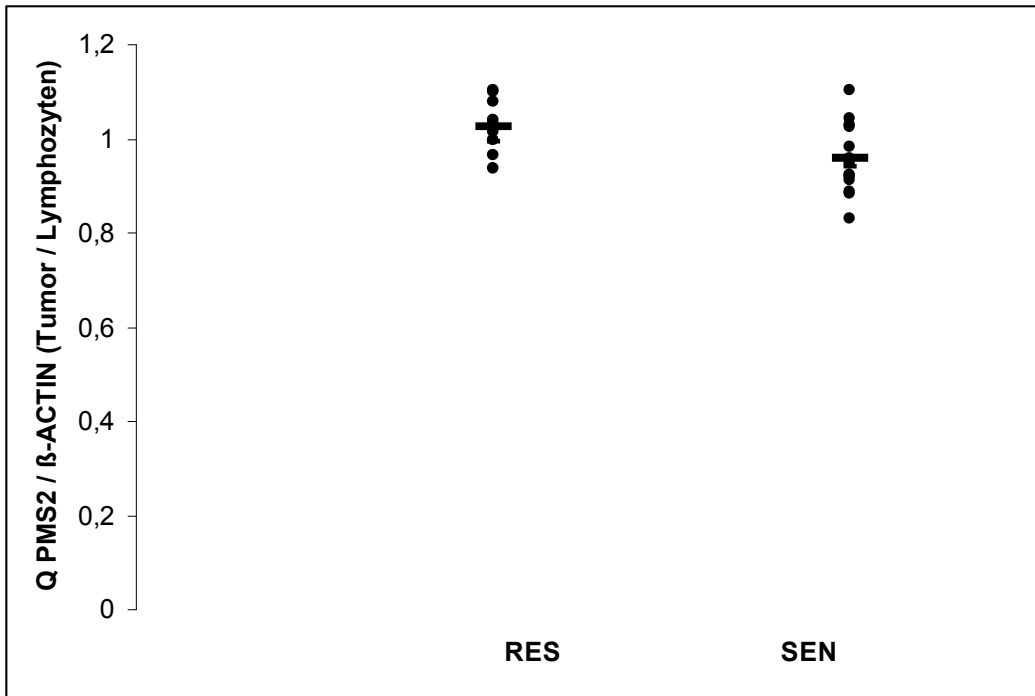
**Abbildung 4:** Dot-blot der *hMSH2* Expression im Vergleich mit  $\beta$ -Actin. (res = resistent, sen = sensibel)



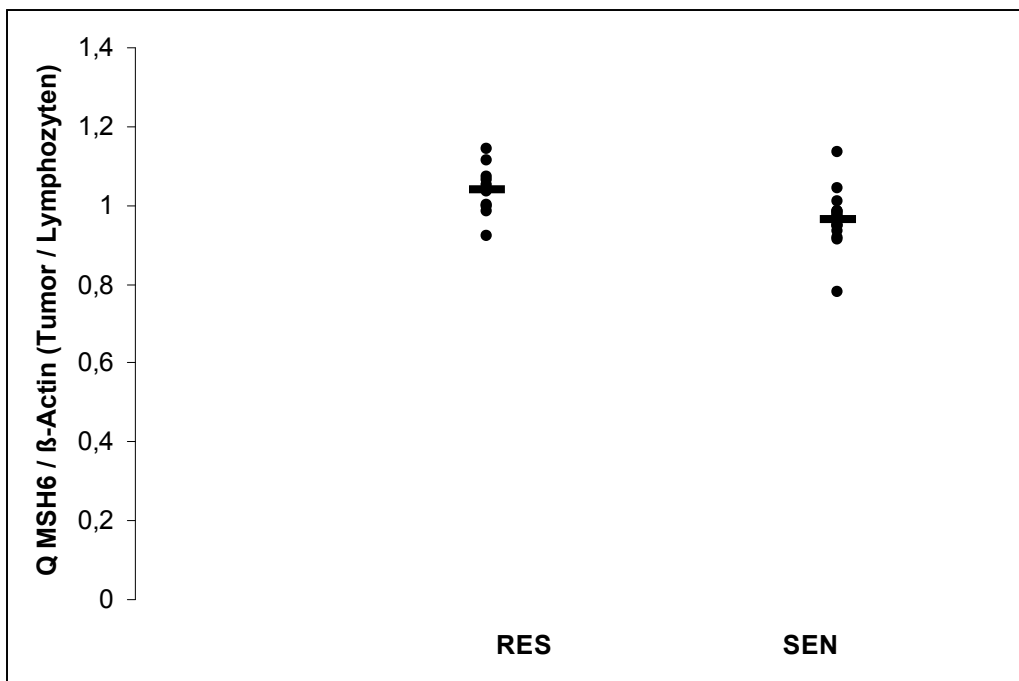
**Abbildung 5:** Dot-blot der hMLH1 Expression im Vergleich mit  $\beta$ -Actin. (res = resistent, sen = sensibel)



**Abbildung 6:** Dot-blot der hPMS1 Expression im Vergleich mit  $\beta$ -Actin. (res = resistent, sen = sensibel)



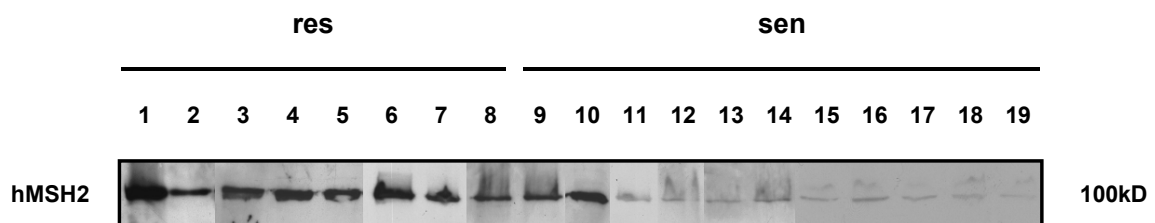
**Abbildung 7:** Dot-blot der hPMS2 Expression im Vergleich mit  $\beta$ -Actin. (res = resistent, sen = sensibel)



**Abbildung 8:** Dot-blot der hMSH6 Expression im Vergleich mit  $\beta$ -Actin. (res = resistent, sen = sensibel)

### 4.3 hMSH2 Western Blot

Bei 19 von den insgesamt 25 Glioblastomen war eine Kultivierung von ausreichend Tumormaterial möglich, so dass neben der RNA auch Gesamt-Protein isoliert werden konnte. 10µg des Proteins wurden auf PAA Gele (10%) geladen und nach elektrophoretischer Auftrennung und nach Transfer auf PVDF Membranen schließlich zunächst mit den Primär-Antikörpern und dann mit den Sekundär-Antikörpern inkubiert. In **Abbildung 9** sind die Western Blots dargestellt. Damit auch hier ein übersichtlicher Vergleich mit den erhobenen Chemoresistenz-Daten möglich wird, wurden auch diese Western Blot Gele gescannt und dann ausschnittsweise aneinandergereiht. So entsprechen die ersten 8 Banden in **Abbildung 10** den Zellkultur-Nummern der multi-resistent getesteten Gliome 573, 588, 735, 819, 822, 765, 732 und 685. Man erkennt bei allen resistenten Gliomen eine kräftige hMSH2 Protein-Expression. Die folgenden zwei Banden in **Abbildung 9** (9 und 10) entsprechen den sensitiven Tumoren mit den Zellkultur Nummern 722 und 821, auch hier sind deutliche hMSH2 Protein Banden zu sehen. Dagegen zeigten die übrigen sensitiv getesteten Tumore (Banden 11-19, in **Abbildung 9**), entsprechend den Zellkultur Nummern 654, 731, 677, 636, 768, 767, 766, 761 und 723, außerordentlich schwache hMSH2 Protein-Expressionen. Insgesamt exprimierten so alle resistent getesteten Glioblastome die hMSH2 Proteine deutlich, dagegen zeigten 9 von 11 sensitiven Tumoren (81%) lediglich sehr schwache hMSH2 Protein-Expressionen. Die Protein-Expressionen aller 19 Gliome korrelierten mit den in Abschnitt RT-PCR dargestellten mRNA-Expressionen, alle Tumore mit deutlich detektierbarer *hMSH2* mRNA zeigten auch hohe hMSH2 Protein-Level und umgekehrt.



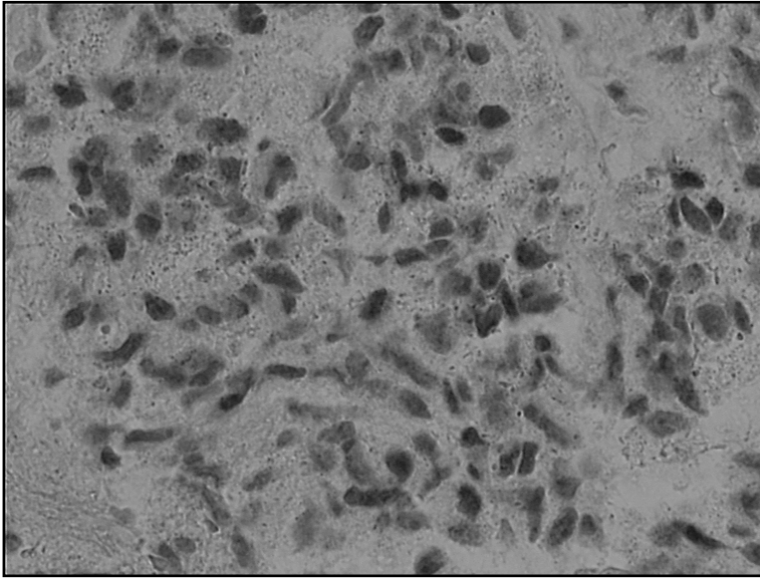
**Abbildung 9:** Western Blot Analyse der hMSH2 Protein-Expression. (res = resistent, sen = sensibel)

#### 4.4 hMSH2 Immunhistochemie

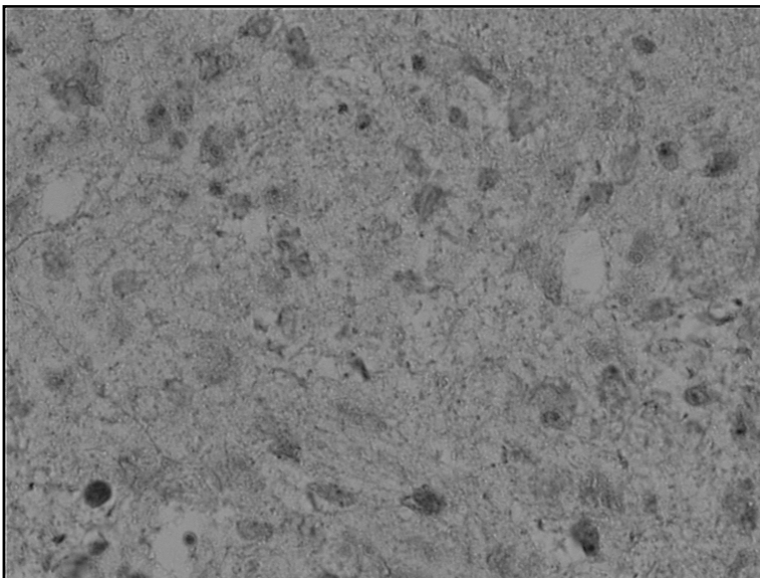
Da die Western Blot Analyse mit Proteinen aus Zellkulturmaterial durchgeführt wurde, entsprechen diese Daten den *in vitro* Verhältnissen. Um einen Vergleich mit den *in situ* Konditionen zu bekommen, wurden deshalb noch immunhistochemische Untersuchungen zur hMSH2 Protein-Expression an 12 Tumorbiopsien angefertigt.

Wie in Abschnitt Material und Methoden beschrieben, wurde die Immunfärbung mit der indirekten Immun-Peroxidase-Reaktion durchgeführt. Dabei zeigten sich die Tumore recht heterogen hinsichtlich der Immunreaktion. Es gab Areale mit deutlicher hMSH2 Immunreaktivität, aber auch Areale mit schwacher oder negativer Immunreaktion innerhalb eines Tumors. Insgesamt zeigten allerdings die Tumore mit deutlicher hMSH2 Protein-Expression im Western Blot eine positive nukleäre Reaktion in etwa 60-70% der Tumorzellen, während die Gliome mit geringen hMSH2 Protein-Mengen im Western Blot nur in etwa 30% der Tumorzellen eine positive nukleäre Reaktion demonstrierten. Bei einem Glioblastom mit kräftiger hMSH2 Expression im Western Blot zeigten sich nur etwa 40% der Tumorzellen positiv in der Immunhistochemie, der Tumor zeigte sich allerdings auch im dazugehörigen H&E-Schnitt recht zellarm, so dass es sich hier auch vornehmlich um die Infiltrationszone des Glioblastoms gehandelt haben kann.

In den **Abbildungen 10** und **11** werden beispielhaft hochvergrößerte Ausschnitte aus dem resistenten Tumor mit der Zellkultur Nummer 732 und dem sensitiven Glioblastom mit der Zellkultur Nr. 654 gezeigt.



**Abbildung 10:** hMSH2 Immunhistochemie Tumorzellkultur Nr. 732



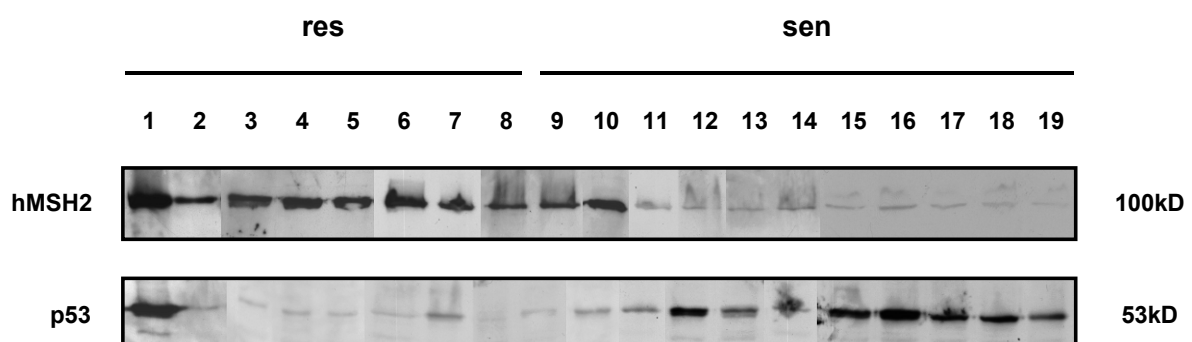
**Abbildung 11:** hMSH2 Immunhistochemie Tumorzellkultur Nr. 654

## 4.5 TP53 Status

### 4.5.1 TP53 Western Blot

Um die TP53 Protein-Stabilisation des kultivierten Tumorgewebes zu erfassen, wurden Western Blot Analysen mit 10µg Protein von den 19 der insgesamt 25 Glioblastome durchgeführt, bei denen ausreichend Zellkulturmaterial zur Proteinextraktion vorhanden war.

Auch hier wurden aus Gründen der besseren Übersicht die Gele gescannt und ausschnittsweise zusammengestellt. Die Tumore sind in der gleichen Reihenfolge wie bei den hMSH2 Western Blots angeordnet. In **Abbildung 12** sind die Western Blots sowohl der TP53 Protein-Stabilisation als auch zum Vergleich nochmal der hMSH2 Protein-Expression dargestellt. Bis auf einen Tumor (Zellkultur Nr. 573, Bande 1) zeigten alle Glioblastome mit starker hMSH2 Protein-Expression niedrige TP53 Protein-Level, während umgekehrt alle Tumore mit geringer hMSH2 Protein-Expression deutlich mehr TP53 Protein aufwiesen. So zeigten 7 der 8 resistenten Tumoren deutliche hMSH2 Protein-Expression, aber nur wenig TP53 Protein, ein resistenter Tumor (Zellkultur Nr. 573) zeigte sowohl deutliche hMSH2 als auch TP53 Protein-Banden. 9 der 11 sensitiv getesteten Gliome demonstrierten dagegen schwache hMSH2 Protein-Expression mit deutlicher TP53 Protein-Stabilisierung, die übrigen 2 sensitiven Tumore zeigten ein umgekehrtes Muster (Banden 9 und 10, **Abbildung 12**).

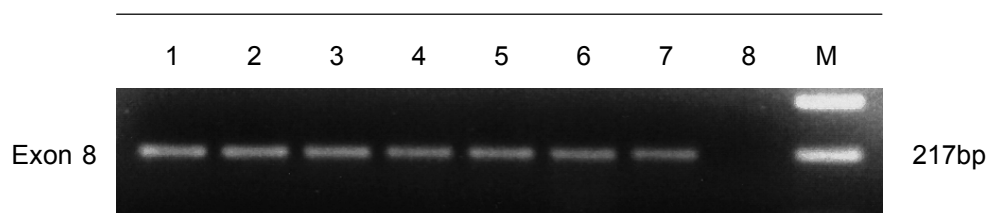


**Abbildung 12:** Western Blot Analysen von TP53 und hMSH2 im Vergleich. (res = resistent, sen = sensibel)



#### 4.5.2 *TP53* Mutationsanalyse

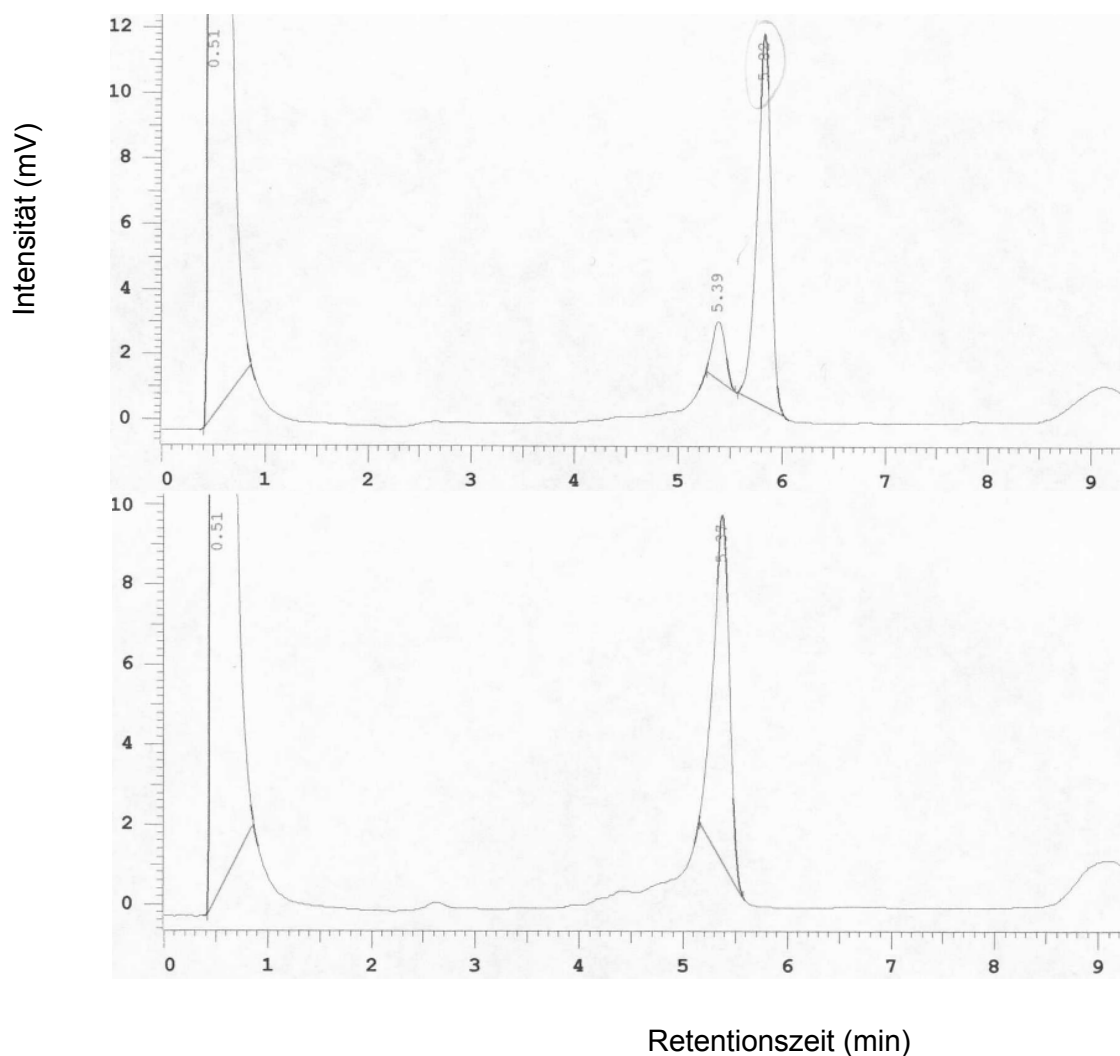
Die genomische DNA wurde mit spezifischen Oligonukleotiden der Exone 5-8 des *TP53* Gens amplifiziert. Zur Kontrolle der durchgeführten PCR wurden die Amplifikate auf 2% Agarose-Gele aufgetragen. In **Abbildung 13** sind beispielhaft die Amplifikate von Exon 8 von 7 Glioblastomen dargestellt. Die Banden 1-7 entsprechen den Tumorzellkultur-Nrn. 573, 588, 654, 765, 767, 819 und 822, Spur Nr.8 einer Negativkontrolle ohne DNA-Template. Man erkennt bei allen Tumorproben recht gleichmäßige spezifische Banden der 217bp Fragmente, bei der Negativkontrolle hingegen finden sich keine spezifischen oder unspezifischen Amplifikate. Genauso stellten sich die PCR-Amplifikate der Exone 5, 6 und 7 aller untersuchten 18 Glioblastome dar. Von der Intensität der Amplifikate auf den Agarose-Gelen konnte dann die Menge der einzusetzenden PCR-Produkte für die DHPLC-Analyse abgeschätzt werden.



**Abbildung 13:** *TP53* Exon 8, PCR-Amplifikate (217 bp) von 7 Glioblastomen (Spur 1-7) und einer Negativkontrolle (Spur 8).

Zwischen 8 und 15µg der PCR-Amplifikate wurden auf die Chromatographie-Säule geladen und durch einen linearen Azetonitril-Gradienten ausgewaschen, die DHPLC-Bedingungen für die einzelnen Exons sind im Abschnitt 4.2.7.2. aufgeführt. Die Retentionszeiten, das heißt die Zeit, nach der die DNA-Fragmente wieder aus der Säule gewaschen wurden, hingen von der Konformation der PCR-Produkte ab. Entsprechend konnte man anhand der Retentionszeiten und der Form der Elutionskurven die auf Mutationen hinweisende Heteroduplex-DNA erkennen. In **Abbildung 14** sind beispielhaft die Elutionskurven mit entsprechenden Retentionszeiten von

Exon 6 der Tumoren mit den Zellkultur-Nrn. 685 und 735 dargestellt. Bei Tumor Nr. 735 zeigte sich ein schmaler Peak mit einer Retentionszeit von 5,37 min., bei Tumor Nr. 685 dagegen zeigte sich ein deutlich abweichendes Elutionkurvenmuster mit einem Peak bei 5,39 min. und einem weiteren Peak bei 5,82 min., was das Vorhandensein von DNA-Heteroduplices anzeigte. So konnte eine Mutation in Exon 6 von Tumor Nr. 685 detektiert werden. Der Tumor reagierte multiresistent im Chemoresistenztest.



**Abbildung 14:** DHPLC-Analyse *TP53*, Exon 6. In der oberen Elutionskurve eine *TP53* Mutation (Zellkultur Nr. 685), darunter die Elutionskurve eines *TP53* Wild-Typ (Zellkultur Nr. 732).

Die in der DHPLC Analyse detektierte Mutation wurde durch Direktsequenzierung von Exon 6 bewiesen, es handelte sich um eine Punktmutation mit einem Basenaustausch von ATC zu ACC in Codon 195, was zu einem Aminosäureaustausch vom ursprünglichen Isoleucin gegen Threonin führte.

## 5. Diskussion

### 5.1 Zielsetzung und Ergebnisse

Trotz zahlreicher technischer Fortschritte in der Therapie maligner Gliome ist die Prognose für diese Patienten außerordentlich ungünstig. Nur wenige Patienten profitieren von der Chemotherapie, diese allerdings zeigen dann deutlich längere Überlebenszeiten. Die Mechanismen, die der die Chemotherapie limitierenden Chemoresistenz in malignen Gliomen zu Grunde liegen, sind nur sehr eingeschränkt verstanden. So gibt es bisher keine validen Faktoren, die das Ansprechen auf die belastende Chemotherapie voraussagen können. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Systeme untersucht, von denen gezeigt wurde, dass sie beim Ansprechen auf Therapie induzierte DNA-Schäden eine Rolle spielen: das *TP53* und das MMR System.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter konstitutiven Bedingungen, d.h. ohne experimentelle Behandlung, die Expression der 5 MMR Gene *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* und *hMSH6* auf transkriptioneller Ebene untersucht. Dabei konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich der Expression von *hMSH2* festgestellt werden. So konnten 2 Gruppen von Glioblastomen identifiziert werden, zum einen Tumore mit deutlicher Expression, zum anderen Gliome mit sehr schwacher bis hin zu fehlender *hMSH2* Expression. Es zeigte sich eine enge Korrelation mit der entsprechenden Protein Expression von *hMSH2*, sowohl im Western Blot als auch in der Immunhistochemie, was zeigte, dass die Unterschiede ganz offensichtlich durch transkriptionelle Regulation zu Stande kamen. Interessanterweise

konnte ein inverses Muster der TP53 Protein-Expression bzw. -Stabilisation gezeigt werden. Tumore mit deutlicher TP53 Protein-Stabilisation zeigten nur schwache Expression von hMSH2, Tumore mit niedrigem TP53 Protein-Level zeigten deutliche hMSH2 Expressionen. Außerdem konnte eine bemerkenswerte Korrelation dieser TP53/hMSH2 Muster mit der Chemoresistenz *in vitro* gefunden werden. Alle bis auf einen der resistenten Tumoren zeigten deutliche hMSH2 Expressionen bei geringem TP53 Protein-Level und alle bis auf zwei sensitive Tumore gehörten zu der Gruppe mit niedriger hMSH2 Expression bei deutlicher TP53 Protein-Stabilisierung. Bei den resistenten Glioblastomen konnte eine Mutation in Exon 6 von *TP53* entdeckt werden, bei den sensitiven Tumore konnten keine Mutationen detektiert werden.

In der Diskussion soll im Weiteren zunächst auf die angewendeten Methoden in einzelnen Abschnitten kritisch eingegangen werden. Hierzu werden einleitend die jeweiligen spezifischen Problemstellungen kurz erörtert, es wird der Einsatz der verwendeten Methoden kritisch diskutiert und kurz auf die jeweiligen gewonnenen Ergebnisse eingegangen. In einer dann folgenden Darstellung werden die Ergebnisse im Zusammenhang ausführlich kritisch diskutiert und zu einer Schlußfolgerung formuliert.

## 5.2 Chemosensitivitäts-Testung

Trotz aggressiver Therapie liegt die mediane Überlebenszeit von Glioblastompatienten bei etwa einem Jahr. Es gibt zwar Studien, die über signifikante mediane Überlebensverlängerungen durch Chemotherapie berichten, dieser Effekt auf die Gesamtüberlebenszeit von Glioblastompatienten ist allerdings allenfalls gering (Shapiro et al. 1986). Andere Autoren bezweifeln sogar den signifikanten Effekt auf die mittlere Überlebenszeit (Hofer und Herrmann 2001). Einigkeit herrscht allerdings im Hinblick auf die Tatsache, dass es unter Chemotherapie deutlich mehr Langzeitüberlebende, das heißt Lebende länger als 18 Monate nach Diagnosestellung, gibt. Es existiert also offensichtlich unter den Patienten

eine Subpopulation, die besonders auf die Zytostatika anspricht und die es gilt, mit Hilfe der Bestimmung von prädiktiven Faktoren herauszufiltern.

Aus dem oben dargestellten ergibt sich, dass ein Hauptproblem der Chemotherapie die ausgeprägte Chemoresistenz eines Großteils dieser malignen Gliome ist (Shapiro et al. 1982). Um diese Chemoresistenz besser zu verstehen, wurden *in vitro* Testsysteme etabliert, die die Resistenz quantifizieren sollten. Daraus ableitend sollte so auch die Chemoresistenz *in vivo* vorausgesagt werden, um basierend auf diesen *in vitro* Daten individuelle Therapie-Schemata für die Patienten zu erstellen (Rosenblum et al. 1984, Salmon et al. 1978 und 1984).

Zellkulturen von humanen Gliomen haben sich als gut durchführbare Methodik herausgestellt, so dass man große Teile der Tumorbiopsien mit gutem Erfolg ohne ausgeprägte Fibroblasten-Kontaminationen in Kultur bringen kann. Permanente Linien entwickeln sich allerdings nicht immer (Kimmel et al. 1987). Dass es sich nach wie vor um maligne Zellen glialen Ursprungs handelt, kann man mit immunologischen, biochemischen und genetischen Untersuchungen determinieren (Bigner et al. 1981, Shapiro et al. 1984).

Es gibt grundsätzlich 3 Techniken Tumorzellen zu kultivieren, zum einen als sog. Monolayer-Kulturen, d.h. einschichtige Tumorzell-Lagen in Petrischalen oder Kulturflaschen. Es gibt aber auch die Möglichkeit in der Zellkultur das 3-dimensionale Wachstum von Gliomen nachzuahmen, zum einen mit sog. Organkulturen, zum anderen mit der `Multizell-Tumor-Sphäroid`-Technik (MTS). Bei den Organkulturen werden die Tumorzellen in eine gel-artige Matrix implantiert, in die die Zellen weiter invadieren und so die Architektonik eines Tumores *in vivo* immitieren (Saez et al. 1977). Bei der MTS-Technik werden die Tumorzellen unter Bedingungen gehalten, die ebenfalls ein 3-dimensionales Wachstum induzieren und zwar in Form von Sphäroiden, also kugelförmige Formationen. Die Zellen proliferieren hierbei in den Randzonen, das Tumorzentrum dagegen stirbt bei einer bestimmten Größe des Sphäroids ab, so dass zentral eine Nekrose entsteht. Die *in vivo* Konditionen werden hierdurch ebenfalls immitiert (Darling et al. 1983). Die Monolayer-Kulturen haben zwar den Nachteil, dass ein räumliches Wachstums *in vitro* nicht nachgeahmt wird, bei dieser Technik kann allerdings ausreichend

Tumorzell-Material kultiviert werden, so dass ausreichend DNA, RNA und Protein für quantitative und semiquantitative Untersuchungen gewonnen werden können. Es wurde von mehreren Autoren berichtet, dass Glioblastom-Zellen in Agar nicht so gut wachsen wie in Monolayer-Kulturen (Rosenblum et al. 1978). Außerdem wird dieses System nicht zuletzt auf Grund der recht einfachen Handhabung von zahlreichen Autoren benutzt und gehört so sicher zu den etabliertesten Verfahren (Kimmel et al. 1987), so dass auch Vergleiche mit anderen Studien bzw. Arbeiten möglich sind. Aus diesen Gründen ist in der vorliegenden Arbeit dieses Glioblastom-Zellkultur-System verwendet worden.

Für die eigentliche Chemoresistenztestung stehen ebenfalls mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Ein häufig benutzter und gut etablierter Test ist der sog. `Colony Forming Assay` (CFA) (Hamburger und Salmon 1977). Bei diesem Testsystem werden Tumorbiopsien zu Einzel-Zell-Suspensionen disaggregiert, welche dann mit entsprechenden Zytostatika behandelt werden. Diese behandelten Tumorzellen werden dann entweder als Soft-Agar- oder als Monolayer-Kulturen kultiviert. Nach 2-4 Wochen kann man dann die Tumorzell-Kolonien, die in den Kulturen gewachsen sind, hinsichtlich ihrer Anzahl und Größe mit den mitgeführten unbehandelten Kontrollen vergleichen. Der CFA wurde vor allem entwickelt, um den Zytostatikaeffekt auf sog. Tumor-Stammzellen zu untersuchen. An dieser Stelle soll kurz auf dieses Tumor-Stammzell-Konzept eingegangen werden (Buick et al. 1984, Selby et al. 1983). Man geht davon aus, dass ein großer Teil der Tumorzellen nur ein geringes Proliferationspotential hat. Diese Zellen machen zwar den Hauptteil der Tumormasse aus, sie sind aber nicht in der Lage den Tumor deutlich wachsen zu lassen, Metastasen bzw. Satellitenherde zu bilden oder nach Resektion des Tumores ein Tumorrezidiv auftreten zu lassen. Hierfür sind vor allem Zellen verantwortlich, die ein großes Proliferationspotential haben und so nach operativer Entfernung den Tumor und sich selbst wieder neu bilden können. Neben diesen Tumor-Stammzellen gibt es auch Übergänge zwischen Stammzellen und den Tumor-Endzellen, die sog. Transitional-Zellen. Auch diese haben zumeist noch ein hohes Proliferationspotential und werden so zusammen mit den Stammzellen auch als `klonogene` Zellen bezeichnet. Diese beiden letzten

Zellformen sind vor allem für Rezidive und für Metastasen bzw. Satelliten-Herde verantwortlich und sind deshalb das primäre Ziel adjuvanter Chemotherapien, nachdem die Tumormauptmasse operativ entfernt wurde. Der Vorteil des CFA liegt nun darin, dass eben diese Zellen mit hohem Proliferationspotential bei dieser Chemoresistenztestung erfasst werden. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings der nicht unerhebliche Arbeitsaufwand im Labor und der Zeitaufwand von bis zu 4 Wochen (Kimmel et al. 1987). Außerdem muss man auch davon ausgehen, dass es Tumor-Stammzellen gibt, die sich gerade in der G0-Phase befinden, aber sonst das gleiche Potential haben. Solche Zellen würde man mit dem CFA somit nicht sicher erfassen.

Ein anderer Ansatz, die Chemoresistenz *in vitro* zu untersuchen, erfolgt mit Hilfe radioaktiv-markierter Substrate, die in Abhängigkeit von der Proliferations-Aktivität von den Zellen aufgenommen werden. So können Tritium markiertes Thymidin oder Uridin oder auch markierte Aminosäuren in der DNA, RNA bzw. den Proteinen nachgewiesen und die Proliferation nach entsprechender Zytostatika-Exposition bestimmt werden (Kaufmann et al. 1984). Vorteil dieses Testsystems ist die recht einfache und vor allem schnell durchführbare Methode, der Nachteil liegt vor allem darin begründet, dass so lediglich die Proliferations-Inhibition der Zytostatika bestimmt werden kann, nicht aber die Zytotoxizität der Substanzen. Vor allem wenn die Beobachtungszeit der Proliferations-Inhibition nicht lange genug ist, können so vitale Zellen, die erst später wieder proliferieren, übersehen werden und der Test liefert auf diese Weise eventuell falsch positive Ergebnisse. Dass einige Medikamente wie z.B. Methotrexat und 5-Fluoruracil wegen Interaktionen mit dem Stoffwechsel der markierten Substrate nicht getestet werden können, ist ein weiterer Nachteil dieser Methode.

Die heute am häufigsten eingesetzte Methode der Chemoresistenztestung *in vitro* ist der Zytotoxizitäts-Test. Hierzu werden Tumorzellen als Monolayer kultiviert, mit den zu testenden Chemotherapeutika behandelt und danach mit einer Substanz versetzt, die nur in vitalen Zellen in einen bei einer bestimmten Wellenlänge zu detektiernden Farbstoff umgesetzt werden. Ein häufig eingesetztes Testsystem ist der Methyl-Thiazol-Tetrazolium (MTT)-Test, der von Nikkhah et al. (1992) für die *in vitro* Resistenztestung für

Hirntumore optimiert wurde. Je nach Länge der Kultivierung nach der Inkubation mit den Zytostatika kann dann der akut toxische Effekt auf die Tumorzellen, nach kurzer Kultivierung, aber auch der antiproliferative Effekt, nach längerer Kultivierung, erfasst werden. Die Vorteile dieser Methode sind daher auch hier der relativ zum CFA geringere Arbeits- und auch Zeitaufwand, gegenüber den radioaktiven Tests werden aber auch toxische und nicht nur antiproliferative Effekte erfasst. Dies ist allerdings wiederum abhängig von der Länge der Tumorzell-Kultivierung nach Behandlung mit den Zytostatika, so werden bei sehr langer Kultivierung zwar sehr zuverlässig auch später einsetzende antiproliferative Effekte erfasst, dies allerdings auf Kosten der Zytotoxizität und umgekehrt. Ein weiterer Vorteil ist, dass dieser Test heute sicher der am weitesten verbreitete ist und so direkte Vergleiche mit zahlreichen anderen Studien am besten möglich sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Chemoresistenztestung des CFA und des MTT-Tests bei Glioblastomen gut korrelieren (Tonn et al. 1994). Dies sind die Gründe, weshalb auch in der vorliegenden Arbeit das MTT Test-System benutzt wurde.

Ein ganz entscheidender Kritikpunkt bei all diesen *in vitro*-Testsystemen ist, dass man nur bedingt von diesen artefiziellen Ansätzen Rückschlüsse auf die *in vivo* Bedingungen und damit auf die klinische Situation ziehen kann. Deshalb gibt es zahlreiche Arbeiten, die die klinischen Ansprechraten der Chemotherapien mit den *in vitro* Daten vergleichen. So konnte bei Verwendung des CFA gezeigt werden, dass die klinische Resistenz gegen BCNU in bis zu 100% korrekt vorausgesagt werden konnte, die klinische Sensitivität konnte allerdings nur in etwa 70% korrekt vorausgesagt werden (Rosenblum und Gerosa 1984). Ähnliche Daten konnten bei Verwendung zytotoxischer Testsysteme erhoben werden. Auch hier konnte die Resistenz sowohl gegen BCNU als auch gegen CCNU *in vitro* immer korrekt bestimmt werden, die Sensitivität gegenüber diesen Substanzen *in vivo* stimmte nicht immer, nur etwa 67% der *in vitro* sensitiv getesteten Tumore waren auch *in vivo* sensitiv (Kornblith et al. 1981).

Eine Ursache für diese Diskrepanzen hinsichtlich der Sensitivität liegt möglicherweise in der Pharmakokinetik der Medikamente begründet. So sind Parameter wie Bioverfügbarkeit, Verteilungsraum, Penetration durch



biologische Membranen und Metabolisierung in einem Gesamtorganismus ungleich komplexer. Ein anderer Faktor, der den Vergleich zwischen Zellkultur und Tumor *in situ* schwierig gestaltet, ist die Heterogenität der Gliome. Schon bei histopathologischer Betrachtung fällt auf, dass diese Tumore, besonders die Glioblastome, alles andere als homogen sind, was ihnen auch den Namen `Glioblastoma multiforme` mit verliehen hat. Bei weiterer differenzierter Untersuchung zeigen sich nicht nur zwischen individuellen Tumoren, sondern auch innerhalb eines Tumors deutliche Unterschiede der Tumorzellen hinsichtlich der Antigen- und der genetischen bzw. chromosomalen Zusammensetzung (Shapiro et al. 1984). Entsprechend findet man auch ausgeprägte Heterogenitäten hinsichtlich der Chemoresistenz innerhalb eines individuellen Tumors (Yung und Shapiro 1982, Shapiro et al. 1981). Bei Kultivierung entsprechender resistenter oder sensitiver Klone wird so das Gesamtresistenzbild verschoben und die Korrelation zu klinischen Daten wird fehlerhaft.

Trotz dieser Nachteile und Probleme können diese *in vitro* Testsysteme zum Screening auf Resistenzen beispielsweise gegen neu zu etablierende Medikamente eingesetzt werden, bevor eine klinische Testung angestrebt wird. Offensichtlich wird die Resistenz mit sehr hoher Sicherheit richtig vorausgesagt, so dass auch molekulare Faktoren hinsichtlich ihres Zusammenhangs mit der Resistenz durchaus sinnvollerweise zunächst in solchen Zellkultursystemen untersucht werden können, bevor auch hier aufwendige, teure und viel Zeit in Anspruch nehmende klinische Studien initiiert werden.

Ein wichtiges Ziel bei der Chemotherapie von Glioblastomen ist es, wie bereits einleitend beschrieben, eben solche bisher fehlenden prädiktiven Faktoren, seien es klinische oder molekulare Marker, zu identifizieren. Zum einen um eine differenzierte Indikationsstellung zur Chemotherapie möglich zu machen, zum anderen, um aus diesen Erkenntnissen um molekulare Resistenzmechanismen und ihre Bedeutung in Glioblastomen therapeutische Alternativen zu entwickeln, ist dies für die zukünftige Glioblastom-Forschung außerordentlich wichtig.

Aus diesen Gründen ist die Chemoresistenztestung *in vitro* mit dem MTT Test für die Ziele der vorliegenden Arbeit sicherlich ein adäquates, wenn auch kein perfektes System, den Resistenzstatus zu erheben.

In der vorliegenden Arbeit wurden 25 Glioblastome auf Chemoresistenzen gegenüber 10 Zytostatika untersucht. Zwei zusätzliche Medikamente (Temodal und CCNU) wurden erst später in den routinemäßig angewandten MTT-Test etabliert, so dass hier nur Daten bei zwei Tumoren (Zellkultur Nr. 819 und 822) vorliegen. Ein Tumor galt immer dann als resistent, wenn der Sensitivitäts-Index (SI), d.h. der Quotient aus vitalen Tumorzellen nach Behandlung und vitalen Tumorzellen ohne Behandlung, über 0,5 lag. Dies entsprach mindestens 50% vitaler Tumorzellen nach Behandlung. Die Festlegung dieser Grenzwerte entsprach derjenigen, die auch im CFA von anderen Autoren benutzt wurde (Bertelsen et al. 1984). MTT-Testsysteme mit diesen Grenzwerten wiederum korrelierten mit den Daten aus dem CFA, die Resistenz lag insgesamt allerdings im MTT Test um etwa 10% höher (Nikkhah et al. 1992).

Neun der untersuchten Tumore zeigten sich resistent gegenüber allen getesteten Substanzen, ein Tumor reagierte nur noch sensitiv auf Vincristin. Diese Tumore wurden als `multi-resistent` bezeichnet. 15 Glioblastome dagegen zeigten sich sensitiv gegenüber mindest 3 Zytostatika, diese Tumore wurden daher insgesamt noch als `sensitiv` bezeichnet. Diese Einteilung bzw. Grenzziehung zwischen resistenten und sensitiven Glioblastomen erscheint zunächst etwas willkürlich, wenn man sich allerdings die zusammengefassten Daten der Resistenztestung in **Tabelle 6** ansieht, so erkennt man, dass die *in vitro* wirksamsten Medikamente Cytosin-Arabinosid, Vincristin, Taxol, VM 26 (Teniposid), Temodal und auch Mitoxantron sind. Außerdem fällt auf, dass fast alle Tumore, die gegenüber einem der eben genannten Zytostatika sensitiv sind, auch auf mindestens 2 andere dieser Substanzen reagieren. Die resistenten Tumore zeigen sich dagegen gleich gegen alle genannten Zytostatika unempfindlich, lediglich ein Tumor kann noch als sensitiv gegenüber Vincristin gewertet werden. Es erscheint daher durchaus gerechtfertigt diese beiden Gruppen zu unterscheiden und sie hinsichtlich ihrer MMR Gen Expression und ihres *TP53* Status zu vergleichen. Interessant ist weiterhin, dass die von uns untersuchten

Glioblastome durchweg resistent gegen die Nitrosoharnstoffderivate ACNU und BCNU sind. CCNU wurde nur bei 2 Tumoren untersucht, die ebenfalls resistent reagierten; eine relevante Aussage kann hiervon sicher nicht abgeleitet werden. Dies sind aber die Substanzen, die hauptsächlich in der Chemotherapie eingesetzt werden, sowohl als Monotherapie als auch als Kombinationstherapie, zum Beispiel im Rahmen des PCV-Schemas (siehe Abschnitt `Chemotherapie`). Wenn man bedenkt, dass die Resistenz recht zuverlässig durch *in vitro* Daten vorausgesagt werden kann, so erscheint es nicht sehr sinnvoll an Chemotherapie-Protokollen festzuhalten, die aus Nitrosoharnstoffderivaten bestehen oder diese zumindest beinhalten. In einer Metaanalyse von über 1600 Arbeiten zum Thema Chemoresistenz in Gliom-Zellen zwischen 1966 und 1995 konnte gezeigt werden, dass gerade die Nitrosoharnstoffe im Vergleich zu anderen Medikamenten wie Vincristin, Mitoxantron und Cytosin-Arabinosid *in vitro* außerordentlich schlecht wirken. Die Autoren gehen sogar so weit zu sagen, dass die Therapie-limitierende Chemoresistenz und dadurch die enttäuschenden Therapieergebnisse der Glioblastome mit an der Auswahl der eingesetzten Medikamente, vor allem der Nitrosoharnstoffe, liegen könnten (Wolff et al. 1999). Insgesamt stimmen die in dieser Arbeit erhobenen *in vitro* Daten also recht gut mit den Ergebnissen dieser Metaanalyse überein, man muss daher davon ausgehen, dass man sie für eine valide Korrelation mit den MMR Gen Expressionen und dem *TP53* Status verwenden kann.

### 5.3 Mismatch-Reparatur (MMR) Gen-Expression

Ein Hauptprinzip der systemischen Chemotherapie maligner Tumore ist, dass man trotz systemischer Verabreichung der Medikamente möglichst selektiv die malignen Zellen, nicht dagegen die gesunden Zellen eines Organismus, vernichten will. Dieses Prinzip funktioniert umso besser, je empfindlicher die Tumorzellen gegenüber den eingesetzten Substanzen sind. Da maligne Tumore sich charakteristischerweise durch eine recht hohe Proliferationsrate auszeichnen, sind sie im Vergleich mit weniger Teilungsaktiven Zellen deutlich vulnerabler gegenüber Agentien, die die DNA beschädigen oder mit der DNA interagieren. Die systemische

Chemotherapie, mit für einen kranken Menschen vertretbaren Nebenwirkungen, funktioniert also nur, solange die Tumorzellen relativ zum Normalgewebe sensibler gegenüber den eingesetzten Medikamenten sind. Ein Hauptproblem der systemischen zytotoxischen Therapie ist daher die Chemoresistenz, die sowohl primär vorhanden sein kann, aber auch erst sekundär im Rahmen der Therapie auftreten kann.

Durch deutliche Fortschritte beim Verständnis der Tumor-Zellbiologie in den letzten Jahren kennt man heute eine Reihe von Resistenzmechanismen in malignen Zellen (Bates et al. 1994). So findet man Veränderungen bei Medikamenten-Transportmechanismen und Metabolisierungen, durch Mutation oder aberante Expression veränderte Zielmoleküle, Abweichungen bei der DNA Reparatur und Alterationen der Zellzyklus-Regulation einschließlich der Apoptose.

Bei der Chemotherapie maligner Gliome spielen Resistenzentwicklungen eine große Rolle. Vor allem 2 Mechanismen sind bei Glioblastomen als Ursache dieser Chemoresistenzen nachgewiesen worden. Zum einen führen Überexpressionen der O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGAT) zu Resistenzen gegenüber alkylierenden Substanzen (Wiestler et al. 1984). Zum anderen konnten in Xenograft-Studien Defekte der zellulären Mismatch-Reparatur (MMR) als Ursache von Chemoresistenzen in humanen Gliomen nachgewiesen werden (Kat et al. 1993, Friedman et al. 1997). Während die Überexpressionen der O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase lediglich zu Resistenzen gegenüber alkylierenden Substanzen führt, ist das MMR-System an der Detektion von verschiedenen DNA-Läsionen beteiligt. So konnten bei MMR defizienten Tumoren neben Resistenzen gegenüber Alkylantien wie Nitrosoharnstoffe, Procarbazin und Temozolomid (Kat et al. 1993, Cin et al. 1996, Friedman et al. 1997, Dosch et al. 1998) auch Resistenzen gegenüber Antimetaboliten wie 6-Thioguanin und Mercaptopurine (Swann et al. 1996, Dorsch et al. 1998), gegenüber Cisplatin und Carboplatin (Aebi et al. 1996, Fink et al. 1996, Lage et al. 1999), gegenüber Anthrazyklinen wie Doxorubicin (Corbett et al. 1993), gegenüber Topoisomerase II Hemmer wie VM 26 (Teniposid) (Walker et al. 1991) und gegenüber dem Dihydrofolatreduktase-Hemmer Methotrexat (Frouin et al. 2001) gezeigt werden. Auf die entsprechenden Mechanismen, wie das MMR-

System die entsprechenden Resistenzen vermittelt wurde bereits einleitend im Abschnitt 1.3.3 eingegangen. Daraus ergibt sich, dass gerade das MMR System bei der in Glioblastomen häufig zu detektierenden Multi-Resistenz möglicherweise eine große Rolle spielt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit dieses System und nicht die recht spezifisch bei einzelnen Zytostatika-Klassen einsetzenden Resistenzmechanismen, wie beispielsweise die AGAT-Überexpression, untersucht.

Defekte im MMR System findet man regelmäßig bei den `Hereditären Nicht-Polypösen K(C)olon K(C)arzinomen` (HNPCC, oder *Lynch*-Syndrom) (Fishel et al. 1993). Mutationen in einem der MMR Gene führen hier zu den charakteristischen Mikrosatelliten-Instabilitäten (MSI), d.h. Verlängerungen und Verkürzungen kurzer repetitiver Sequenzen in der DNA. Dies zeigt eine Form der genetischen Instabilität an, die für die Tumorigenese bei diesen Patienten mit verantwortlich gemacht wird. Es konnte gezeigt werden, dass MMR defekte Kolon-Karzinom Zelllinien solcher Patienten chemoresistent sind im Vergleich zu MMR profizienten Zellen und dass Transfektion dieser Zellen mit nicht mutiertem *hMLH1* tragendem Chromosom 3 die verstärkte Chemoresistenz wieder aufhob (Koi et al. 1994). Ähnliches konnte auch in einem Glioblastom-Xenotransplantat gezeigt werden, hier führte die fehlende Expression von *hMSH2* ebenfalls zu Resistenzen gegenüber alkylierenden Substanzen wie BCNU (Friedman et al. 1997). Die Häufigkeit von Mikrosatelliten-Instabilitäten, die Defekte im MMR-System anzeigen, in Glioblastomen ist von mehreren Autoren untersucht worden. So zeigten Dams et al. (1995) MSI in Glioblastomen und anaplastischen Astrozytomen in über 30%, zählten allerdings auch Tumore mit Instabilitäten in nur einem von 7 Mikrosatelliten Loci dazu, was die heute geforderte 40%-Grenze für die Definition von MSI deutlich unterschreitet. Andere Autoren zeigten entsprechend deutlich geringere Frequenzen zwischen 0-3% (Zhu et al. 1996, Wooster et al. 1994, Amariglio et al. 1995). Man muss also eher davon ausgehen, dass MSI in astroglialen Tumoren im Vergleich zu HNPCC Tumoren sehr selten sind. Eine Ausnahme bilden hier Patienten mit dem *Turcot*-Syndrom, die Keimzellmutationen in einem der MMR Gene haben können und neben kolorektalen Karzinomen u.a. auch Glioblastome entwickeln können; hier ist die MSI Frequenz entsprechend höher. Eine

Untersuchung der Häufigkeiten von MSI und MMR Gen-Mutationen an jungen Patienten mit malignen Gliomen zeigte, dass 18% dieser Tumore MSI entsprechend der heute gültigen 40%-Grenze aufwiesen. Alle diese Patienten wiesen Keimzellmutationen in einem der MMR-Gene auf und ein großer Teil entwickelte zusätzlich später Kolonkarzinome, so dass die Kriterien der Diagnose eines *Turcot*-Syndromes erfüllt waren (Leung et al. 1998). Daraus folgt, dass, wenn MSI in sporadischen Glioblastomen selten sind, auch genetische Veränderungen in Form von Mutationen des MMR-Systems in Glioblastomen eher selten sind. Verminderte Expressionen von MMR Genen sind dagegen in diesen Tumoren durchaus häufiger anzutreffen. So konnten verminderte transkriptionelle Expressionen von *hMSH2* in 42%, *hMLH1* in 21% und von *hPMS1* in 18% in höhergradigen Astrogliomen gefunden werden (Wei et al. 1997). Da davon auszugehen ist, dass Mutationen eher selten sind, spielen bei Glioblastomen wahrscheinlich andere Faktoren eine Rolle, die zur verminderten Expression führen. So konnte gezeigt werden, dass Hypermethylierungen von CpG-Islands in Promotoren bei Gliomen zu verminderter Expression verschiedener Gene führten (Fueyo et al. 1996), u.a. von *p16/CDKN2* (Costello et al. 1996). An dieser Stelle soll bereits kurz erwähnt werden, dass kürzlich im *hMSH2* Promotor ein TP53-Response-Element identifiziert wurde, welches ebenfalls Einfluss auf die Expression dieses Gens haben kann (Warnick et al. 2001).

Aufgrund der dargestellten Daten und Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der MMR Gene untersucht, nicht dagegen der MSI- oder MMR Gen-Mutations-Status. Die Expression wurde allerdings nicht nur auf transkriptioneller Ebene, sondern auch auf Proteinebene detektiert. Verwendet wurde dazu eine RT-PCR, mit der die transkriptionelle Aktivität von *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* und *hMSH6* erfasst wurde. Obwohl dies lediglich ein semiquantitativer Ansatz war, konnten so schon von Wei et al. (1997) Unterschiede deutlich detektiert werden. Bei der eben genannten Studie wurden lymphatische Zellen als Kontrollgewebe mit untersucht. Der Vergleich normalen lymphatischen Gewebes mit malignen glialen Tumoren ist sicherlich problematisch. Da aber astrogliales Normalgewebe von entsprechenden Patienten nicht so leicht zu gewinnen und zu kultivieren ist, kann man von den Kontrollen in der Arbeit

von Wei et al. sicherlich einen gewissen Anhalt über einen sog. Normalzustand bekommen. In der vorliegenden Arbeit ist als sog. Normalgewebe RNA aus Blutlymphozyten gewonnen worden, die MMR Gen-Expression entsprach dabei soweit vergleichbar den bereits publizierten Daten von Wei et al. (1997). Die Expression von MMR Genen in lymphatischem Gewebe wie z.B. Blutlymphozyten ist aber sicher nur eingeschränkt mit der Expression in glialen Zellen oder aber glialen Tumoren vergleichbar. Im Vergleich zum lymphatischen Gewebe kann man so nicht unbedingt bei entsprechend niedriger oder erhöhter Expression in Glioblastomen von einem entsprechend pathologischen Zustand ausgehen. So kann in glialem Gewebe mit im Vergleich zu lymphatischem Gewebe eher geringerer Proliferationsaktivität auch eine deutlich geringere Expression von MMR Genen der Normalzustand sein. In diesem Sinne wären dann die von Wei et al. (1997) gezeigten Daten von verminderter Expression von MMR Genen in Glioblastomen möglicherweise auch der sog. Normalzustand. Die starke Expression bei einem Teil dieser Tumore wäre dann in diesem Sinne möglicherweise eine Überexpression mit entsprechenden funktionellen Konsequenzen. Um die Expression der verschiedenen MMR-Gene untereinander besser vergleichbar zu machen, wurden die densitometrisch erfassten Expressionen sowohl zum  $\beta$ -Actin als Haushaltskontrolle als auch zum lymphatischen Gewebe ins Verhältnis gesetzt. Das in der vorliegenden Arbeit benutzte sog. Normalgewebe diente dementsprechend nicht zur Determination von 'normal' oder pathologisch, sondern zur relativen und vergleichbaren Darstellung der unterschiedlichen Expression in den verschiedenen Tumoren.

In der vorliegenden Arbeit wurden 25 Glioblastome hinsichtlich ihrer transkriptionellen Aktivität der MMR-Gene untersucht. Hierbei zeigten 12 der 25 Tumoren Expressionen aller untersuchten Gene, 13 Glioblastome (52%) zeigten allerdings deutlich schwächere bis fehlende *hMSH2* mRNA-Level. Bei den anderen MMR-Genen gab es lediglich kleine Schwankungen, aber keine deutlichen Unterschiede. Die Frequenz der verminderten Expression von *hMSH2* entsprach so etwa derjenigen von Wei et al. (1997) mit 42%. *hMLH1* und *hPMS1* zeigten in der eben genannten Arbeit in deutlich geringerem Ausmaß ebenfalls Unterschiede. Wenn man sich die Daten in

der vorliegenden Arbeit ansieht, so erkennt man auch hier gewisse Schwankungen. Die Daten sind also durchaus konsistent, vor allem in Hinblick auf die recht kleinen Fallzahlen in beiden Arbeiten.

Das *hMSH2* scheint bei Glioblastomen das interessanteste Gen des MMR Systems zu sein, so dass in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ob die verminderte Expression auf mRNA-Ebene sich auch auf der Proteinebene, also der eigentlichen Funktions-Ebene, ebenfalls zeigt. Von 19 der 25 Tumore konnte ausreichend Zellkulturmaterial gewonnen werden, so dass hinreichend Protein extrahiert werden konnte. So konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der RT-PCR und der Western-Blot-Analysen sehr eng korrelierten, was den Schluss nahelegt, dass *hMSH2* offensichtlich vor allem transkriptionell reguliert wird. Dies konnte ebenfalls von anderen Autoren gezeigt werden, posttranslationale Regulationen scheinen erst bei mutierten MMR-Genen eine Rolle zu spielen (Chang et al. 2000). Ein weiterer Hinweis dafür, dass Mutationen in diesen Genen bei Glioblastomen keine große Rolle zu spielen scheinen.

Sowohl die RT-PCR als auch die Western-Blot Analysen wurden mit Zellkulturmaterial durchgeführt. Dies war sicherlich sinnvoll, da schließlich auch die Chemoresistenztestungen in der Zellkultur durchgeführt wurden. Trotzdem gibt es auch hier das Problem, dass der *in situ* Status so nicht unbedingt repräsentiert wird. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit auch immunhistochemische Untersuchungen an 12 der 19 im Western Blot untersuchten Gliome durchgeführt. Dies aber lediglich mit dem Ziel, die Validität der *in vitro* Daten zu überprüfen, somit um auszuschließen, dass sich die Tumoren hinsichtlich ihres MMR- bzw. besonders ihres *hMSH2*-Status *in vitro* gegenüber der *in situ* Situation anders verhalten. Die immunhistochemische Expression schwankte zwar deutlich nicht nur zwischen den Tumoren, sondern war auch innerhalb eines individuellen Tumors sehr heterogen, die Ergebnisse der *in vitro* und *in situ* Untersuchungen korrelierten allerdings gut. Glioblastome mit kräftiger *hMSH2* Protein Expression im Western Blot zeigten in 60-70% der Tumorzellen eine unterschiedlich starke spezifische Immunreaktion in der Immunhistochemie, umgekehrt zeigten Tumore mit nur 30-40% schwach bis mäßig positiver Zellen *in situ* deutlich schwächere *hMSH2* Protein-Level im



Western Blot. Hieraus darf auf keinen Fall eine Korrelation immunhistochemischer Daten der hMSH2 Expression mit Chemoresistenzdaten abgeleitet werden, die Immunhistochemie zeigte lediglich die, wenn auch eingeschränkte, Gültigkeit der *in vitro* Daten an.

Die entscheidenden Ergebnisse, nämlich die Korrelation der hMSH2 Expression mit der Chemoresistenz, sollen allerdings nicht an dieser Stelle sondern in einem zusammenfassenden Abschnitt in Zusammenhang mit den *TP53* Daten diskutiert werden.

#### 5.4 *TP53* Status

Der Verlust eines Alleles von Chromosom 17p und *TP53* Mutationen werden in niedriggradigen Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen und den sekundären Glioblastomen mit etwa gleicher Häufigkeit von etwa 40-50% gesehen (Louis et al. 1994). In de novo Glioblastomen liegt die Frequenz von *TP53* Mutationen mit etwa 10% allerdings deutlich darunter (Watanabe et al. 1996). Insgesamt liegt die Häufigkeit von *TP53* Mutationen bei Glioblastomen bei etwa 30%. Die Frequenz von *TP53* Protein-Stabilisationen, also Protein-Akkumulationen, liegt noch deutlich höher (Newcomb et al. 1993). So findet man dieses Phänomen bei über 90% der sekundären und bei weniger als 35% der de novo Glioblastome (Watanabe et al. 1996).

In verschiedenen Studien wurde untersucht, ob diese häufig zu detektierenden *TP53* Alterationen mit klinischen Parametern, vor allem der Prognose, aber auch mit Radio- oder Chemotherapieresistenzen, korrelieren und so eine Prädiktion ermöglichen. Die Daten sind allerdings recht inkonsistent und insgesamt muss man wohl eher von einem nur marginalen prognostischen Voraussagewert von *TP53*-Veränderungen ausgehen (Nieder et al. 2000).

Interessant ist allerdings, dass das MMR-System nach Detektion von DNA-Läsionen unter anderem *TP53* Protein abhängige Apoptose-Signalwege initiiert. So konnte gezeigt werden, dass der MutS-alpha Komplex, bestehend aus hMSH2 und hMSH6, nötig ist, um die Apoptose als Antwort auf O6-

Alkylguanin-Läsionen, hervorgerufen durch alkylierende Zytostatika, zu induzieren. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die TP53 Protein Stabilisation als Antwort auf O6-Alkylguanin-Läsionen ebenfalls MutS-alpha abhängig ist (Hickman und Samson 1999). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass TP53 Protein abhängige Signalwege bei der Apoptose-Induktion durch andere in der Klinik eingesetzte Zytostatika eine Rolle spielen. So moduliert der TP53 Protein-Status von Tumorzellen die Chemoresistenz in Zusammenhang mit der MMR Funktion. Defekte von TP53 in MMR defizienten Tumoren verstärken die Resistenz gegenüber 6-Thioguanin und Etoposid (VP 16), hingegen vermindern sie interessanterweise die Resistenz gegenüber Cisplatin (Lin et al. 2001). Dies weist schon darauf hin, dass offensichtlich die Chemoresistenz nicht von Einzelfaktoren, sondern von einem komplexen Zusammenspiel vieler Faktoren abhängt. Chemotherapie-Response gegenüber Cytosin-Arabinosid, aber auch gegenüber Alkylantien wie Temozolomid und Nitrosoharnstoffen, hängen ebenfalls mit dem TP53 Status zusammen, da nach Exposition mit diesen Substanzen TP53 Protein abhängige Apoptose-Signalwege aktiviert werden (Anderson et al. 1999, Hirose et al. 2001).

Der *TP53* Status spielt nach dem oben Gesagten also vor allem im Zusammenhang mit dem MMR-System für die Chemoresistenz in Glioblastomen durchaus eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der *TP53* Status in den untersuchten Tumoren bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die *TP53* mRNA-Expression sehr variabel ist und häufig nicht mit den entsprechenden TP53 Protein Daten korrelierte (Koga et al. 1996). Dies weist darauf hin, dass die häufig zu detektierende TP53 Protein Stabilisation posttranslational reguliert ist. Aus diesem Grund wurde keine *TP53* RT-PCR durchgeführt, sondern die TP53 Protein Stabilisation der Tumorzellkulturen erfasst. Die Proteinstabilisation *in situ* ist mittels Immunhistochemie an Paraffinmaterial bereits gut untersucht (Newcomb et al. 1993), so dass in der vorliegenden Arbeit das TP53 Protein mit der für Zellkulturen adäquaten Western Blot Analyse erfasst wurde.

Da, wie bereits oben geschildert, für einen Teil der TP53 Protein-Stabilisationen Mutationen in den konservierten und für die DNA Bindung zuständigen Exons 5-8 verantwortlich sind, wurden die Tumore auch

hinsichtlich ihres Mutationsstatus in diesen Exons untersucht. Erst kürzlich wurde über den Einsatz einer denaturierenden Hochdruck Flüssigkeits-Chromatographie (Denaturing High Pressure Liquid Chromatographie, DHPLC) zur *TP53* Mutationsanalyse bei ovariellen Tumoren berichtet (Gross et al. 2001). Die Vorteile dieser von Oefner und Underhill (1998) beschriebenen Methode liegt darin, dass man größere Mengen an DNA-Proben recht schnell und mit akzeptablem Laboraufwand analysieren kann. Gross et al. konnten zeigen, dass die DHPLC eine sensitive und effiziente Methode zur *TP53* Mutationsanalyse darstellt, die gerade zum Screening größerer Probenmengen geeignet ist. In der kürzlich veröffentlichten Analyse von Keller et al. (2001) wurden mit den auch in der vorliegenden Arbeit benutzten DHPLC-Bedingungen 10 von 10 vorher charakterisierten *TP53* Sequenzvariationen (Mutationen und Polymorphismen) detektiert. Man muss also davon ausgehen, dass die verwendete DHPLC *TP53* Mutationsanalyse eine adäquate Methode zur Bestimmung des *TP53* Mutations Status in der vorliegenden Arbeit ist. Die auf diese Weise gefundene Mutation wurde dann durch Direktsequenzierung des entsprechenden Exons bestätigt und charakterisiert.

Wie bereits bei den Ergebnissen besprochen, war bei 19 von den insgesamt 25 Tumoren ausreichend Zellkulturmaterial vorhanden, so dass Protein extrahiert werden konnte. Insgesamt zeigten 9 von 19 (~47%) untersuchten Glioblastomen kräftige *TP53* Protein-Banden als Zeichen einer *TP53* Protein-Stabilisation. Diese Frequenz liegt in etwa in dem für *de novo* Glioblastome erwarteten Bereich von ca. 30-40%, aber deutlich unter dem für sekundäre Glioblastome erwarteten Wert von 90%.

Bei 18 der insgesamt 25 Tumore konnte ausreichend genomische DNA zur Mutationsdetektion extrahiert werden. Dabei konnte bei einem Tumor eine Mutation an Kodon 195 in Exon 6 detektiert werden. Dies führte zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Threonin. Insgesamt zeigte sich so bei den untersuchten Tumoren eine *TP53* Mutationsfrequenz von 5,5 %. Auch dieser Wert liegt recht nahe an der erwarteten Frequenz von etwa 10% bei *de novo* Glioblastomen. Detaillierte klinische Daten zu den Tumoren konnten leider nicht gewonnen werden, das durchschnittliche Alter der

Patienten lag allerdings bei über 58 Jahre, was ebenfalls dem durchschnittlichen Alter von de novo Glioblastom-Patienten entspricht.

Die entscheidenden Ergebnisse, nämlich die Korrelation der *TP53* Daten mit der Chemoresistenz und der MMR Gen-Expression, sollen aber in dem nun folgenden zusammenfassenden Abschnitt diskutiert werden.

## 5.5 Zusammenfassende Diskussion und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine positive Korrelation von *hMSH2* mRNA und *hMSH2* Protein-Expression und Multi-Chemoresistenz in humanen *de novo* Glioblastomen. Ebenso findet sich eine inverse Korrelation von *hMSH2* Expression und *TP53* Proteinstabilisation. Diese Daten zeigen somit, dass hohe *hMSH2* Expression, möglicherweise im Zusammenhang mit normalem *TP53*, ein Prädiktor für Chemoresistenz und niedrige *hMSH2* Expression im Zusammenhang mit *TP53* Protein-Stabilisation ein Prädiktor für Chemosensitivität sein kann. Diese Ergebnisse stehen allerdings im Gegensatz zu Chemoresistenz- Daten sowohl von sporadischen als auch von familiären Tumoren vor allem des HNPCC Spektrums. In diesen Tumoren führen Defekte der MMR Gene, vor allem der Verlust bzw. die Mutation von *hMSH2*, zur Chemoresistenz (Fink et al 1998). Mutationen von MMR Genen gelten als die Ursache des familiären Tumor-Syndroms HNPCC oder *Lynch*-Syndrom (Fishel et al. 1993) mit vor allem Kolorektalen Karzinomen, aber auch Ovarialtumoren und auch Glioblastomen. Mutationen dieser Gene sind bei den mit Abstand häufigeren sporadischen Gliomen sicher selten, die verminderte Expression scheint allerdings regelmäßig auch in diesen Tumoren zu finden zu sein, wie die vorliegende Arbeit und andere Daten zeigen (Wei et al. 1997). Experimentelle Daten zeigten, dass *hMSH2* in Glioblastomen herunter reguliert wurde, die wiederholt mit dem Zytostatikum Procarbazin behandelt worden sind und darunter resistent wurden (Friedman et al. 1997). Die Resultate der vorliegenden Arbeit sind gegensätzlich zu diesen Daten, allerdings sind die Ansätze auch deutlich unterschiedlich. So wurden in dieser Arbeit die MMR Expression vor einer Therapie erfasst, in vielen anderen Studien dagegen wurde die Expression

nach Chemotherapie, bzw. die Antwort auf Chemotherapie nach Veränderung des MMR-Status untersucht. Wenn man all diese Erkenntnisse zusammen betrachtet, so scheinen Veränderungen des MMR-Systems durchaus eine Rolle bei der Chemoresistenz auch in humanen Glioblastomen zu spielen; die genaue Stellung dieses Reparatur Systems bei der Chemoresistenz in den glialen Tumoren ist allerdings noch nicht ganz klar. Es gibt nur wenige Daten über den MMR Gen-Status in humanen Glioblastomen. Wei et al. (1997) zeigten, dass *hMSH2* in etwa 42% aller Gliome deutlich vermindert exprimiert wird; diese Daten entsprechen den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnissen. Mikrosatelliten-Instabilitäten (MSI) dagegen konnte von der Arbeitsgruppe lediglich in einem Tumor gefunden werden, ein Hinweis dafür, dass die eigentliche Mismatch-Reparatur noch funktioniert. MMR-defekte Tumorzellen zeigen dagegen typischerweise MSI (Aaltonen et al. 1993, Fishel et al. 1993), maligne Gliome dagegen mit 0-3% eher selten (Zhu et al. 1996, Wooster et al. 1994, Amariglio et al. 1995). Man müsste eine höhere Rate an MSI erwarten, wenn die verminderte Expression von MMR Genen funktionelle Effekte hätte; das ist allerdings nicht der Fall. Deshalb wäre es auch möglich, dass die bisher als vermindert bezeichnete *hMSH2* Expressionen den 'Normalzustand' zeigen und die höhere Expression einen aktivierten bzw. verstärkten Reparatur-Status anzeigen, der wiederum für Chemoresistenzen verantwortlich ist. So könnte die hohe Expression von *hMSH2* bei resistenten Tumoren in der vorliegenden Arbeit erklärt werden.

Alterationen des *TP53* Status, entweder durch Mutationen oder durch funktionelle Protein-Stabilisierungen, findet man in einem großen Teil maligner Gliome. Interessanterweise führen Veränderungen von *TP53* Protein ebenfalls zu Veränderungen der Chemoresistenz. Außerdem scheint es Verbindungen zwischen dem MMR-System und *TP53* zu geben, die die Chemoresistenz beeinflussen. Defekte von *TP53* Protein in MMR defizienten Tumoren verstärken die Resistenz beispielsweise gegenüber 6-Thioguanin und Etoposid (VP 16), hingegen vermindern sie interessanterweise die Resistenz beispielsweise gegenüber Cisplatin (Lin et al. 2001). Der MutS-alpha Komplex aus *hMSH2* und *hMSH6* Proteinen stabilisiert das *TP53* Protein und initiiert so die Apoptose nach DNA- Schädigung mit Bildung von

O6-Alkylguanin Läsionen (Hickman und Samson 1999). Auf der anderen Seite arbeitet TP53 als Schädigungs-abhängiger Transkriptionsfaktor. So wurde ein TP53 Protein Response Element im *hMSH2* Promotor kürzlich beschrieben, so dass *hMSH2* möglicherweise auch durch *TP53* reguliert wird (Warnick et al. 2001). Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit eine inverse Korrelation von *hMSH2* und *TP53* Proteinen gezeigt werden. Diese Daten könnten darauf hinweisen, dass *hMSH2* in glialen Tumoren konstitutiv durch *TP53* reguliert wird und so die gegensätzliche negative Regulation beider Faktoren erklärt werden könnte. Niedrige *TP53* Protein-Level unter konstitutiven, d.h. nicht stimulierten Bedingungen, entsprechen dem 'Normalzustand'. Entsprechend zeigen die dazu gehörigen hohen *hMSH2* Expressionen ebenfalls eine normale Situation an. Im Gegensatz dazu zeigen die konstitutiv *TP53* Protein stabilisierenden Tumoren ein alteriertes *TP53* System an. So konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die durch Mutation als auch durch funktionelle Stabilisation veränderten *TP53* Proteine eine veränderte transkriptionelle Aktivität verschiedener Gene z.B. nach experimenteller Bestrahlung aufweisen. Das könnte bedeuten, dass der alterierte *TP53* Status - sei es durch Mutation oder auch funktionelle Stabilisierung - die transkriptionelle Regulierung von *hMSH2* verändert und dieser Zustand wichtig für eine primäre Chemoresistenz sein könnte. Um diese komplexen Zusammenhänge noch etwas genauer zu beleuchten, ist es wichtig, noch einmal die Mechanismen zu diskutieren, über die das MMR-System zum Zelltod führt. DNA Schäden, z.B. durch Zytostatika, werden durch einen Komplex aus *hMSH2* und *hMSH6* Proteinen erkannt, dieser Komplex, auch als MutS alpha bezeichnet, führt zu einer Aktivierung und Komplexierung von *hMLH1* und *PMS2* (MutL), wodurch die Apoptose induziert werden kann. Letzters geschieht, zumindest als Antwort auf O6-Alkylguanin-Läsionen, über eine *TP53* Stabilisierung (Hickmann et al. 1999) oder über eine *TP53* Protein-Phosphorylierung (Li et al. 1999) mit anschließender Aktivierung der Apoptose-Maschinerie. Aber die Proteine des MMR-Systems sind nicht nur an der Induktion der Apoptose beteiligt, sondern auch maßgeblich in die Reparatur von DNA Schäden involviert. Die Reparaturmöglichkeiten bzw. -kapazitäten hängen allerdings nicht nur von der Intaktheit des MMR-Systems, sondern auch von den Bedingungen für

das System ab. So ist vor allem ein ausreichend langer G<sub>2</sub>M-checkpoint-arrest eine wichtige Voraussetzung für die Reparaturmöglichkeiten. So sind *TP53* Wildtyp tragende humane Glioblastomzellen durch einen im Vergleich zu *TP53* mutierten bzw. defekten Zellen deutlich längeren G<sub>2</sub>M checkpoint-Arrest gekennzeichnet (Hirose et al. 2001). Dieser lässt, möglicherweise in Kombination mit einer starken hMSH2 Expression durch das TP53 Response-Element im *hMSH2* Promotor, ausgeprägte, durch das MMR System initiierte, Reparaturprozesse zu mit konsekutiver Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Substanzen.

Abschließend muss man sagen, dass den Chemoresistenzmechanismen humaner Glioblastome komplexe molekulare Interaktionen zu Grunde liegen. Dies bestätigte auch wiederum eine kürzlich veröffentlichte Arbeit, die zeigen konnte, dass PTEN das TP53 Protein vor der MDM2 bedingten TP53 Degradation schützt und so die Sensitivität gegenüber Zytostatika erhöht (Mayo et al. 2002). Ziel weiterer wissenschaftlicher Arbeit muss daher sein, diese komplexen molekularen Interaktionen weiter zu verstehen. Eine effektive für den Patienten sinnvolle Chemoresistenz- bzw. Chemosensitivitätsdetektion erscheint so nach den in der vorliegenden Arbeit gezeigten und diskutierten Daten in Zukunft durchaus möglich.

## 6. Zusammenfassung

Die Prognose des Glioblastoma multiforme ist sehr schlecht und nur eine kleine Gruppe der betroffenen Patienten profitiert von aggressiven multimodalen Therapien. Vor allem die Chemotherapie trägt bei diesen Patienten zu einer deutlich verlängerten Lebenserwartung bei. Die Mehrheit der Glioblastome zeigt aber eine ausgeprägte Resistenz gegen eine Chemotherapie. Bisher sind die Mechanismen der zu Grunde liegenden Chemoresistenz aber nur unzureichend verstanden. Es gibt Hinweise auf eine wesentliche Beteiligung des Fehlpaarungs- bzw. Mismatch-Reparatur (MMR) -Systems, welches in vielen anderen Tumoren offensichtlich eine Rolle bei der Chemoresistenz spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von 5 MMR-Genen (*hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* und *hMSH6*) unter konstitutiven Bedingungen, d.h. ohne experimentelle Behandlungen, der *TP53* Status und die *in vitro* Chemoresistenz in humanen Glioblastomen untersucht, die dem Subtyp der primären bzw. *de novo* Glioblastome zugeordnet werden konnten. Dabei zeigten sich für die Expression von *hMSH2* signifikante Unterschiede, so dass zwei Gruppen von Glioblastomen identifiziert werden konnten: Eine Gruppe mit einer hohen und eine zweite Gruppe mit einer deutlich verminderten bis hin zu fehlender Expression von *hMSH2*. Dabei fand sich eine gute Übereinstimmung der mRNA-Daten mit der Protein-Expression, was darauf hinwies, dass die *hMSH2* Expression in Glioblastomen offenbar transkriptionell reguliert wird. Das *TP53*, welches ebenfalls häufig in Glioblastomen sowohl genetisch als auch funktionell alteriert ist, zeigt sowohl direkte als auch indirekte Interaktionen mit dem MMR-System. Interessanterweise konnte eine inverse Korrelation der *hMSH2* Expression mit der *TP53* Protein-Stabilisation demonstriert werden. Tumoren mit deutlich detektierbarem *TP53* Protein zeigten geringe *hMSH2*-Expression, Tumoren mit nur gering detektierbarem *TP53* Protein exprimierten *hMSH2* deutlich stärker. Es ergab sich außerdem eine enge Korrelation der quantitativen *in vitro* Chemoresistenz mit diesem molekularen Muster. Alle bis auf einen Tumor aus der Gruppe der resistenten



Glioblastome zeigten eine deutliche hMSH2 Expression und ein geringes TP53 Protein-Niveau. Dagegen wiesen alle bis auf zwei der sensitiv getesteten Tumoren das Muster mit geringer hMSH2 Expression bei hohem TP53 Protein-Niveau auf. Die erhobenen Daten zeigen, dass die primäre Chemoresistenz in malignen Gliomen das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels verschiedener molekularer Faktoren und Mechanismen ist. Durch weitere Untersuchungen und weiteres Verständnis dieser komplexen Interaktionen multipler molekularer Marker und Faktoren scheint so eine sinnvolle Prädiktion der Chemoresistenz bzw. –sensitivität und dadurch eine sinnvolle Patientenselektion für belastende zytostatische Therapien möglich.

## 7. Literaturverzeichnis

(1-258)

1. Acharya, S., T. Wilson, S. Gradia, M. F. Kane, S. Guerrette, G. T. Marsischky, R. Kolodner, R. Fishel. 1996. hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 13629-34.
2. Aebi, S., B. Kurdi-Haidar, R. Gordon, B. Cenni, H. Zheng, D. Fink, R. D. Christen, C. R. Boland, M. Koi, R. Fishel, S. B. Howell. 1996. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res.* 56: 3087-90.
3. Aebi, S., D. Fink, R. Gordon, H. K. Kim, H. Zheng, J. L. Fink, S. B. Howell. 1997. Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res.* 3: 1763-7.
4. Alexander, V., S. S. Leffingwell, J. W. Lloyd, R. J. Waxweiler, R. L. Miller. 1980. Brain cancer in petrochemical workers: a case series report. *Am J Ind Med.* 1: 115-23
5. Amariglio, N., E. Friedman, O. Mor, H. Stiebel, C. Phelan, P. Collins, M. Nordenskjold, F. Brok-Simoni, G. Rechavi. 1995. Analysis of microsatellite repeats in pediatric brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 84: 56-9.
6. Anders, K., G. G. Grabenbauer, U. Schuchardt, R. Fahlbusch, R. Fietkau, R. Sauer, P. Krauseneck. 2000. Accelerated radiotherapy with concomitant ACNU/Ara-C for the treatment of malignant glioma. *J Neurooncol.* 48: 63-73.
7. Anderson, C. N., A. M. Tolkovsky. 1999. A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside. *J Neurosci.* 19: 664-73.
8. Aquilina, G., S. Ceccotti, S. Martinelli, R. Hampson, M. Bignami. 1998. N-(2-chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosourea sensitivity in mismatch repair-defective human cells. *Cancer Res.* 58: 135-41.

9. Baker, S. J., E. R. Fearon, J. M. Nigro, S. R. Hamilton, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, P. vanTuinen, D. H. Ledbetter, D. F. Barker, Y. Nakamura, et al. 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*. 244: 217-21.
10. Bates, S. E., J. I. Regis, R. W. Robey, Z. Zhan, S. Scala, B. J. Meadows. 1994. Chemoresistance in the clinic: overview 1994. *Bull Cancer*. 81 Suppl 2: 55s-61s.
11. Ben David, Y., V. R. Prideaux, V. Chow, S. Benchimol, A. Bernstein. 1988. Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus. *Oncogene*. 3: 179-85.
12. Bertelsen, C. A., V. K. Sondak, B. D. Mann, E. L. Korn, D. H. Kern. 1984. Chemosensitivity testing of human solid tumors. A review of 1582 assays with 258 clinical correlations. *Cancer*. 53: 1240-5.
13. Bigner, D. D. 1981. Biology of gliomas: potential clinical implications of glioma cellular heterogeneity. *Neurosurgery*. 9: 320-6.
14. Black, P. M. 1991. Brain tumors. Part 1. *N Engl J Med*. 324: 1471-6.
15. Blagosklonny, M. V., W. S. el-Deiry. 1996. In vitro evaluation of a p53-expressing adenovirus as an anti-cancer drug. *Int J Cancer*. 67: 386-92.
16. Bond, J. A., F. S. Wyllie, D. Wynford-Thomas. 1994. Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene*. 9: 1885-9.
17. Brem, H., M. G. Ewend, S. Piantadosi, J. Greenhoot, P. C. Burger, M. Sisti. 1995. The safety of interstitial chemotherapy with BCNU-loaded polymer followed by radiation therapy in the treatment of newly diagnosed malignant gliomas: phase I trial. *J Neurooncol*. 26: 111-23.
18. Bronner, C. E., S. M. Baker, P. T. Morrison, G. Warren, L. G. Smith, M. K. Lescoe, M. Kane, C. Earabino, J. Lipford, A. Lindblom, et al. 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*. 368: 258-61.
19. Brooks, W. H. 1972. Geographic clustering of brain tumors in Kentucky. *Cancer*. 30: 923-6.

20. Brown, R., G. L. Hirst, W. M. Gallagher, A. J. McIlwrath, G. P. Margison, A. G. van der Zee, D. A. Anthoney. 1997. hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene*. 15: 45-52.
21. Buetow, P. C., J. G. Smirniotopoulos, S. Done. 1990. Congenital brain tumors: a review of 45 cases. *AJR Am J Roentgenol*. 155: 587-93.
22. Buick, R. N., M. N. Pollak. 1984. Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells, and oncogenes. *Cancer Res*. 44: 4909-18.
23. Burch, J. D., K. J. Craib, B. C. Choi, A. B. Miller, H. A. Risch, G. R. Howe. 1987. An exploratory case-control study of brain tumors in adults. *J Natl Cancer Inst*. 78: 601-9.
24. Burger, P. C., E. R. Heinz, T. Shibata, P. Kleihues. 1988. Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*. 68: 698-704.
25. Calsou, P., B. Salles. 1993. Role of DNA repair in the mechanisms of cell resistance to alkylating agents and cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol*. 32: 85-9
26. Cantor, K. P., C. F. Lynch, M. E. Hildesheim, M. Dosemeci, J. Lubin, M. Alavanja, G. Craun. 1999. Drinking water source and chlorination byproducts in Iowa. III. Risk of brain cancer. *Am J Epidemiol*. 150: 552-60.
27. Carozza, S. E., M. Wrensch, R. Miike, B. Newman, A. F. Olshan, D. A. Savitz, M. Yost, M. Lee. 2000. Occupation and adult gliomas. *Am J Epidemiol*. 152: 838-46.
28. Chang, D. K., L. Ricciardiello, A. Goel, C. L. Chang, C. R. Boland. 2000. Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. *J Biol Chem*. 275: 18424-31.
29. Chen, G., W. J. Zeller. 1994. Increased poly(ADP-ribose) formation in cisplatin-resistant rat ovarian tumor cells. *Anticancer Res*. 14: 1461-7.
30. Chen, A. Y., L. F. Liu. 1994. Mechanisms of resistance to topoisomerase inhibitors. *Cancer Treat Res*. 73: 263-81
31. Chen, S. H., H. D. Shine, J. C. Goodman, R. G. Grossman, S. L. Woo. 1994. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental

- gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 3054-7.
32. Choi, N. W., L. M. Schuman, W. H. Gullen. 1970. Epidemiology of primary central nervous system neoplasms. II. Case-control study. *Am J Epidemiol.* 91: 467-85.
  33. Choi, N. W., L. M. Schuman, W. H. Gullen. 1970. Epidemiology of primary central nervous system neoplasms. I. Mortality from primary central nervous system neoplasms in Minnesota. *Am J Epidemiol.* 91: 238-59.
  34. Cicuttini, F. M., S. F. Hurley, A. Forbes, G. A. Donnan, M. Salzberg, G. G. Giles, J. J. McNeil. 1997. Association of adult glioma with medical conditions, family and reproductive history. *Int J Cancer.* 71: 203-7.
  35. Cocco, P., M. Dosemeci, M. R. Gomez, E. H. Heinemann, P. A. Stewart, A. Blair. 1994. [A retrospective evaluation of exposure to dichloromethane by using a job-exposure matrix]. *Med Lav.* 85: 84-7.
  36. Collins, V. P. 1998. Gliomas. *Cancer Surv.* 32: 37-51
  37. Corbett, A. H., N. Osheroff. 1993. When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chem Res Toxicol.* 6: 585-97.
  38. Corn, B. W., S. M. Marcus, A. Topham, W. Hauck, W. J. Curran, Jr. 1997. Will primary central nervous system lymphoma be the most frequent brain tumor diagnosed in the year 2000? *Cancer.* 79: 2409-13.
  39. Costello, J. F., M. S. Berger, H. S. Huang, W. K. Cavenee. 1996. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res.* 56: 2405-10.
  40. Couldwell, W. T., D. R. Hinton, A. A. Surnock, C. M. DeGiorgio, L. P. Weiner, M. L. Apuzzo, L. Masri, R. E. Law, M. H. Weiss. 1996. Treatment of recurrent malignant gliomas with chronic oral high-dose tamoxifen. *Clin Cancer Res.* 2: 619-22.
  41. Curran, W. J., Jr., C. B. Scott, A. S. Weinstein, L. A. Martin, J. S. Nelson, T. L. Phillips, K. Murray, A. J. Fischbach, D. Yakar, J. G. Schwade, et al. 1993. Survival comparison of radiosurgery-eligible and -ineligible malignant glioma patients treated with hyperfractionated

- radiation therapy and carmustine: a report of Radiation Therapy Oncology Group 83-02. *J Clin Oncol*. 11: 857-62.
42. Dams, E., E. J. Van de Kelft, J. J. Martin, J. Verlooy, P. J. Willems. 1995. Instability of microsatellites in human gliomas. *Cancer Res*. 55: 1547-9.
  43. Darling, J. L., N. Oktar, D. G. Thomas. 1983. Multicellular tumour spheroids derived from human brain tumours. *Cell Biol Int Rep*. 7: 23-30.
  44. Davis, D. L., A. Ahlbom, D. Hoel, C. Percy. 1991. Is brain cancer mortality increasing in industrial countries? *Am J Ind Med*. 19: 421-31
  45. DeAngelis, L. M., P. C. Burger, S. B. Green, J. G. Cairncross. 1998. Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol*. 44: 691-5.
  46. DeLeo, A. B., G. Jay, E. Appella, G. C. Dubois, L. W. Law, L. J. Old. 1979. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76: 2420-4.
  47. Dohrmann, G. J., J. R. Farwell, J. T. Flannery. 1976. Glioblastoma multiforme in children. *J Neurosurg*. 44: 442-8.
  48. Doren, M., S. Tercanli, F. Gullotta, W. Holzgreve. 1997. Prenatal diagnosis of a highly undifferentiated brain tumour--a case report and review of the literature. *Prenat Diagn*. 17: 967-71.
  49. Dosch, J., M. Christmann, B. Kaina. 1998. Mismatch G-T binding activity and MSH2 expression is quantitatively related to sensitivity of cells to methylating agents. *Carcinogenesis*. 19: 567-73.
  50. Dropcho, E. J., S. J. Soong. 1996. The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology*. 47: 684-90.
  51. Drummond, J. T., A. Anthoney, R. Brown, P. Modrich. 1996. Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutLalpha and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *J Biol Chem*. 271: 19645-8.
  52. Duckett, D. R., J. T. Drummond, A. I. Murchie, J. T. Reardon, A. Sancar, D. M. Lilley, P. Modrich. 1996. Human MutSalpha recognizes

- damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 6443-7.
53. el-Deiry, W. S., J. W. Harper, P. M. O'Connor, V. E. Velculescu, C. E. Canman, J. Jackman, J. A. Pietenpol, M. Burrell, D. E. Hill, Y. Wang, et al. 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*. 54: 1169-74.
  54. el-Deiry, W. S. 1997. Role of oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents. *Curr Opin Oncol*. 9: 79-87.
  55. El-Zein, R., M. L. Bondy, L. E. Wang, M. de Andrade, A. J. Sigurdson, J. M. Bruner, A. P. Kyritsis, V. A. Levin, Q. Wei. 1999. Increased chromosomal instability in peripheral lymphocytes and risk of human gliomas. *Carcinogenesis*. 20: 811-5.
  56. Fine, H. A., K. B. Dear, J. S. Loeffler, P. M. Black, G. P. Canellos. 1993. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer*. 71: 2585-97.
  57. Fine, H. A. 1994. The basis for current treatment recommendations for malignant gliomas. *J Neurooncol*. 20: 111-20
  58. Fine, H. A., W. D. Figg, K. Jaeckle, P. Y. Wen, A. P. Kyritsis, J. S. Loeffler, V. A. Levin, P. M. Black, R. Kaplan, J. M. Pluda, W. K. Yung. 2000. Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol*. 18: 708-15.
  59. Fink, D., S. Nebel, S. Aebi, H. Zheng, B. Cenni, A. Nehme, R. D. Christen, S. B. Howell. 1996. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res*. 56: 4881-6.
  60. Fink, D., S. Aebi, S. B. Howell. 1998. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res*. 4: 1-6.
  61. Fishel, R., M. K. Lescoe, M. R. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane, R. Kolodner. 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 75: 1027-38.
  62. Fishel, R., A. Ewel, S. Lee, M. K. Lescoe, J. Griffith. 1994. Binding of mismatched microsatellite DNA sequences by the human MSH2 protein. *Science*. 266: 1403-5.

63. Frenay, M., C. Lebrun, M. Lonjon, P. Y. Bondiau, M. Chatel. 2000. Up-front chemotherapy with fotemustine (F) / cisplatin (CDDP) / etoposide (VP16) regimen in the treatment of 33 non-removable glioblastomas. *Eur J Cancer*. 36: 1026-31.
64. Friedman, H. S., S. P. Johnson, Q. Dong, S. C. Schold, B. K. Rasheed, S. H. Bigner, F. Ali-Osman, E. Dolan, O. M. Colvin, P. Houghton, G. Germain, J. T. Drummond, S. Keir, S. Marcelli, D. D. Bigner, P. Modrich. 1997. Methylator resistance mediated by mismatch repair deficiency in a glioblastoma multiforme xenograft. *Cancer Res*. 57: 2933-6.
65. Friedman, H. S., W. P. Petros, A. H. Friedman, L. J. Schaaf, T. Kerby, J. Lawyer, M. Parry, P. J. Houghton, S. Lovell, K. Rasheed, T. Cloughsey, E. S. Stewart, O. M. Colvin, J. M. Provenzale, R. E. McLendon, D. D. Bigner, I. Cokgor, M. Haglund, J. Rich, D. Ashley, J. Malczyn, G. L. Elfring, L. L. Miller. 1999. Irinotecan therapy in adults with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol*. 17: 1516-25.
66. Friedman, H. S., T. Kerby, S. Fields, J. E. Zilisch, D. Graden, R. E. McLendon, P. J. Houghton, S. Arbuck, I. Cokgor, A. H. Friedman. 1999. Topotecan treatment of adults with primary malignant glioma. The Brain Tumor Center at Duke. *Cancer*. 85: 1160-5.
67. Fritz, G., K. Tano, S. Mitra, B. Kaina. 1991. Inducibility of the DNA repair gene encoding O6-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Mol Cell Biol*. 11: 4660-8.
68. Frouin, I., E. Prosperi, M. Denegri, C. Negri, M. Donzelli, L. Rossi, F. Riva, M. Stefanini, A. I. Scovassi. 2001. Different effects of methotrexate on DNA mismatch repair proficient and deficient cells. *Eur J Cancer*. 37: 1173-80.
69. Fueyo, J., C. Gomez-Manzano, J. M. Bruner, Y. Saito, B. Zhang, W. Zhang, V. A. Levin, W. K. Yung, A. P. Kyritsis. 1996. Hypermethylation of the CpG island of p16/CDKN2 correlates with gene inactivation in gliomas. *Oncogene*. 13: 1615-9.



70. Gieseler, F., A. Glasmacher, D. Kampfe, H. Wandt, V. Nuessler, S. Valsamas, J. Kunze, K. Wilms. 1996. Topoisomerase II activities in AML and their correlation with cellular sensitivity to anthracyclines and epipodophyllotoxines. *Leukemia*. 10: 1177-80.
71. Giordana, M. T., G. B. Bradac, C. A. Pagni, S. Marino, A. Attanasio. 1995. Primary diffuse leptomeningeal gliomatosis with anaplastic features. *Acta Neurochir*. 132: 154-9
72. Goyette, M. C., K. Cho, C. L. Fasching, D. B. Levy, K. W. Kinzler, C. Paraskeva, B. Vogelstein, E. J. Stanbridge. 1992. Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer. *Mol Cell Biol*. 12: 1387-95.
73. Grant, R., J. W. Ironside. 1995. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 detoxifying enzyme distribution in human cerebral glioma. *J Neurooncol*. 25: 1-7
74. Gross, E., M. Kiechle, N. Arnold. 2001. Mutation analysis of p53 in ovarian tumors by DHPLC. *J Biochem Biophys Methods*. 47: 73-81.
75. Gu, L., Y. Hong, S. McCulloch, H. Watanabe, G. M. Li. 1998. ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res*. 26: 1173-8.
76. Hamburger, A. W., S. E. Salmon. 1977. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*. 197: 461-3.
77. Hardell, L., A. Nasman, A. Pahlson, A. Hallquist, K. Hansson Mild. 1999. Use of cellular telephones and the risk for brain tumours: A case-control study. *Int J Oncol*. 15: 113-6.
78. Harlow, E., N. M. Williamson, R. Ralston, D. M. Helfman, T. E. Adams. 1985. Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Mol Cell Biol*. 5: 1601-10.
79. Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S. J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 75: 805-16.
80. Hawn, M. T., A. Umar, J. M. Carethers, G. Marra, T. A. Kunkel, C. R. Boland, M. Koi. 1995. Evidence for a connection between the

- mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res.* 55: 3721-5.
81. Heineman, E. F., Y. T. Gao, M. Dosemeci, J. K. McLaughlin. 1995. Occupational risk factors for brain tumors among women in Shanghai, China. *J Occup Environ Med.* 37: 288-93.
  82. Her, C., N. A. Doggett. 1998. Cloning, structural characterization, and chromosomal localization of the human orthologue of *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 gene. *Genomics.* 52: 50-61.
  83. Herholz, K., U. Pietrzyk, J. Voges, R. Schroder, M. Halber, H. Treuer, V. Sturm, W. D. Heiss. 1993. Correlation of glucose consumption and tumor cell density in astrocytomas. A stereotactic PET study. *J Neurosurg.* 79: 853-8.
  84. Hess, P., G. Aquilina, E. Dogliotti, M. Bignami. 1994. Spontaneous mutations at aprt locus in a mammalian cell line defective in mismatch recognition. *Somat Cell Mol Genet.* 20: 409-21.
  85. Hickman, M. J., L. D. Samson. 1999. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 10764-9.
  86. Hirose, Y., M. S. Berger, R. O. Pieper. 2001. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 61: 1957-63.
  87. Hochberg, F., P. Toniolo, P. Cole. 1984. Head trauma and seizures as risk factors of glioblastoma. *Neurology.* 34: 1511-4.
  88. Hochberg, F., P. Toniolo, P. Cole, M. Salcman. 1990. Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults. *J Neurooncol.* 8: 55-60.
  89. Hofer, S., R. Herrmann. 2001. Chemotherapy for malignant brain tumors of astrocytic and oligodendroglial lineage. *J Cancer Res Clin Oncol.* 127: 91-5.
  90. Hoffman, H. J., P. K. Duffner. 1985. Extraneural metastases of central nervous system tumors. *Cancer.* 56: 1778-82.
  91. Hu, J., K. C. Johnson, Y. Mao, L. Guo, X. Zhao, X. Jia, D. Bi, G. Huang, R. Liu. 1998. Risk factors for glioma in adults: a case-control study in northeast China. *Cancer Detect Prev.* 22: 100-8

92. Huang, J., N. Papadopoulos, A. J. McKinley, S. M. Farrington, L. J. Curtis, A. H. Wyllie, S. Zheng, J. K. Willson, S. D. Markowitz, P. Morin, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, M. G. Dunlop. 1996. APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 9049-54.
93. Hurley, S. F., J. J. McNeil, G. A. Donnan, A. Forbes, M. Salzberg, G. G. Giles. 1996. Tobacco smoking and alcohol consumption as risk factors for glioma: a case-control study in Melbourne, Australia. *J Epidemiol Community Health*. 50: 442-6.
94. Ichimura, K., E. E. Schmidt, H. M. Goike, V. P. Collins. 1996. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene*. 13: 1065-72.
95. Ichimura, K., E. E. Schmidt, A. Miyakawa, H. M. Goike, V. P. Collins. 1998. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer*. 22: 9-15.
96. Infante, P. F., S. S. Epstein, W. A. Newton, Jr. 1978. Blood dyscrasias and childhood tumors and exposure to chlordane and heptachlor. *Scand J Work Environ Health*. 4: 137-50.
97. James, C. D., E. Carlbom, J. P. Dumanski, M. Hansen, M. Nordenskjold, V. P. Collins, W. K. Cavenee. 1988. Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res*. 48: 5546-51.
98. Jenkins, J. R., K. Rudge, G. A. Currie. 1984. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature*. 312: 651-4.
99. Jeremic, B., D. Jovanovic, L. J. Djuric, S. Jevremovic, L. J. Mijatovic. 1992. Advantage of post-radiotherapy chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (mPCV) over chemotherapy with VM-26 and CCNU for malignant gliomas. *J Chemother*. 4: 123-6.
100. Julka, P. K., B. S. Awasthy, G. K. Rath, S. Agarwal, T. Varna, A. K. Mahapatra, R. Singh. 2000. A study of concurrent radiochemotherapy with paclitaxel in glioblastoma multiforme. *Australas Radiol*. 44: 84-7.

101. Kaplan, S., I. Novikov, B. Modan. 1997. Nutritional factors in the etiology of brain tumors: potential role of nitrosamines, fat, and cholesterol. *Am J Epidemiol.* 146: 832-41.
102. Karpati, G., H. Li, J. Nalbantoglu. 1999. Molecular therapy for glioblastoma. *Curr Opin Mol Ther.* 1: 545-52.
103. Kastan, M. B., O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, R. W. Craig. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51: 6304-11.
104. Kastan, M. B., Q. Zhan, W. S. el-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W. V. Walsh, B. S. Plunkett, B. Vogelstein, A. J. Fornace, Jr. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell.* 71: 587-97.
105. Kat, A., W. G. Thilly, W. H. Fang, M. J. Longley, G. M. Li, P. Modrich. 1993. An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 6424-8.
106. Kaufmann, M. 1984. Biochemical short-term predictive assay: results of correlative trials in comparison to other assays. *Recent Results Cancer Res.* 94: 151-60
107. Keller, G., A. Hartmann, J. Mueller, H. Hofler. 2001. Denaturing high pressure liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of somatic p53 mutations. *Lab Invest.* 81: 1735-7.
108. Kennedy, B. J., J. H. Brown, J. W. Yarbro. 1965. Mithramycin (NSC-24559) therapy for primary glioblastomas. *Cancer Chemother Rep.* 48: 59-63.
109. Kim, J. H., S. H. Kim, S. L. Brown, S. O. Freytag. 1994. Selective enhancement by an antiviral agent of the radiation-induced cell killing of human glioma cells transduced with HSV-tk gene. *Cancer Res.* 54: 6053-6.
110. Kim, S. H., J. H. Kim, A. Kolozsvary, S. L. Brown, S. O. Freytag. 1997. Preferential radiosensitization of 9L glioma cells transduced with HSV-tk gene by acyclovir. *J Neurooncol.* 33: 189-94.
111. Kimmell, D. W., J. R. Shapiro, W. R. Shapiro. 1987. In vitro drug sensitivity testing in human gliomas. *J Neurosurg.* 66: 161-71.

112. King, R. W., P. K. Jackson, M. W. Kirschner. 1994. Mitosis in transition. *Cell*. 79: 563-71.
113. Kiu, M. C., C. N. Chang, W. C. Cheng, T. K. Lin, C. W. Wong, S. G. Tang, W. M. Leung, L. H. Chen, Y. S. Ho, K. T. Ng, et al. 1995. Combination chemotherapy with carmustine and cisplatin before, during, and after radiotherapy for adult malignant gliomas. *J Neurooncol*. 25: 215-20
114. Kleihues, P., P. C. Burger, B. W. Scheithauer. 1993. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol*. 3: 255-68.
115. Kleihues, P., L. H. Sobin. 2000. World Health Organization classification of tumors. *Cancer*. 88: 2887.
116. Kleihues, P., H. Ohgaki. 2000. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol*. 28: 164-70.
117. Koga, H., S. Zhang, K. Washiyama, T. Ichikawa, K. Onda, T. Kumanishi. 1996. Analysis of p53 gene mutations in human glioma cell lines. *Noshuyo Byori*. 13: 1-10.
118. Koi, M., A. Umar, D. P. Chauhan, S. P. Cherian, J. M. Carethers, T. A. Kunkel, C. R. Boland. 1994. Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res*. 54: 4308-12.
119. Kolodner, R. 1996. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev*. 10: 1433-42.
120. Kornblith, P. L., B. H. Smith, L. A. Leonard. 1981. Response of cultured human brain tumors to nitrosoureas: correlation with clinical data. *Cancer*. 47: 255-65.
121. Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, W. V. Walsh, M. B. Kastan. 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 7491-5.
122. Kuratsu, J., Y. Ushio. 1996. Epidemiological study of primary intracranial tumors: a regional survey in Kumamoto Prefecture in the southern part of Japan. *J Neurosurg*. 84: 946-50.

123. Kuratsu, J., Y. Ushio. 1997. Epidemiological study of primary intracranial tumours in elderly people. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 63: 116-8.
124. Kyritsis, A. P., M. L. Bondy, M. Xiao, E. L. Berman, J. E. Cunningham, P. S. Lee, V. A. Levin, H. Saya. 1994. Germline p53 gene mutations in subsets of glioma patients. *J Natl Cancer Inst*. 86: 344-9.
125. Lage, H., M. Dietel. 1999. Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 125: 156-65
126. Landis, S. H., T. Murray, S. Bolden, P. A. Wingo. 1999. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin*. 49: 8-31, 1.
127. Lane, D. P., L. V. Crawford. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 278: 261-3.
128. Lang, F. F., D. C. Miller, M. Koslow, E. W. Newcomb. 1994. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg*. 81: 427-36.
129. Leach, F. S., N. C. Nicolaides, N. Papadopoulos, B. Liu, J. Jen, R. Parsons, P. Peltomaki, P. Sistonen, L. A. Aaltonen, M. Nystrom-Lahti, et al. 1993. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. 75: 1215-25.
130. Lee, M., M. Wrensch, R. Miike. 1997. Dietary and tobacco risk factors for adult onset glioma in the San Francisco Bay Area (California, USA). *Cancer Causes Control*. 8: 13-24.
131. Lee, T. T., G. R. Manzano. 1997. Third ventricular glioblastoma multiforme: case report. *Neurosurg Rev*. 20: 291-4
132. Leung, S. Y., T. L. Chan, L. P. Chung, A. S. Chan, Y. W. Fan, K. N. Hung, W. K. Kwong, J. W. Ho, S. T. Yuen. 1998. Microsatellite instability and mutation of DNA mismatch repair genes in gliomas. *Am J Pathol*. 153: 1181-8.
133. Levin, V. A., W. M. Wara, R. L. Davis, P. Vestnys, K. J. Resser, K. Yatsko, S. Nutik, P. H. Gutin, C. B. Wilson. 1985. Phase III comparison of BCNU and the combination of procarbazine, CCNU, and vincristine administered after radiotherapy with hydroxyurea for malignant gliomas. *J Neurosurg*. 63: 218-23.

134. Li, G. M., P. Modrich. 1995. Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 1950-4.
135. Libermann, T. A., H. R. Nusbaum, N. Razon, R. Kris, I. Lax, H. Soreq, N. Whittle, M. D. Waterfield, A. Ullrich, J. Schlessinger. 1985. Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *J Cell Sci Suppl.* 3: 161-72
136. Lin, X., K. Ramamurthi, M. Mishima, A. Kondo, R. D. Christen, S. B. Howell. 2001. P53 modulates the effect of loss of DNA mismatch repair on the sensitivity of human colon cancer cells to the cytotoxic and mutagenic effects of cisplatin. *Cancer Res.* 61: 1508-16.
137. Linzer, D. I., A. J. Levine. 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell.* 17: 43-52.
138. Liu, L., S. Markowitz, S. L. Gerson. 1996. Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to 1,3-bis(2-chloroethyl)nitrosourea. *Cancer Res.* 56: 5375-9.
139. Longley, M. J., A. J. Pierce, P. Modrich. 1997. DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J Biol Chem.* 272: 10917-21.
140. Louis, D. N., A. von Deimling, R. Y. Chung, M. P. Rubio, J. M. Whaley, R. H. Eibl, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, A. D. Thor, B. R. Seizinger. 1993. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 52: 31-8.
141. Louis, D. N. 1994. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 53: 11-21.
142. Lowe, S. W., H. E. Ruley, T. Jacks, D. E. Housman. 1993. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 74: 957-67.
143. Lowe, S. W., S. Bodis, A. McClatchey, L. Remington, H. E. Ruley, D. E. Fisher, D. E. Housman, T. Jacks. 1994. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science.* 266: 807-10.

144. Maher, E. A., F. B. Furnari, R. M. Bachoo, D. H. Rowitch, D. N. Louis, W. K. Cavenee, R. A. DePinho. 2001. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 15: 1311-33.
145. Malkin, D., F. P. Li, L. C. Strong, J. F. Fraumeni, Jr., C. E. Nelson, D. H. Kim, J. Kassel, M. A. Gryka, F. Z. Bischoff, M. A. Tainsky, et al. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* 250: 1233-8.
146. Maltzman, W., L. Czyzyk. 1984. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol.* 4: 1689-94.
147. Masuda, H., C. Miller, H. P. Koeffler, H. Battifora, M. J. Cline. 1987. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84: 7716-9.
148. Mayo, L. D., J. E. Dixon, D. L. Durden, N. K. Tonks, D. B. Donner. 2002. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *J Biol Chem.* 277: 5484-9.
149. McDermott, M. W., P. H. Gutin, D. A. Larson, P. K. Sneed. 1990. Interstitial brachytherapy. *Neurosurg Clin N Am.* 1: 801-24.
150. Mello, J. A., S. Acharya, R. Fishel, J. M. Essigmann. 1996. The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem Biol.* 3: 579-89.
151. Mennel, H. D., K. J. Zulch. 1972. [Formal pathogenesis of experimentally induced brain tumors]. *Acta Neuropathol.* 21: 140-53
152. Merlo, A., J. G. Herman, L. Mao, D. J. Lee, E. Gabrielson, P. C. Burger, S. B. Baylin, D. Sidransky. 1995. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1: 686-92.
153. Modrich, P. 1991. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet.* 25: 229-53
154. Modrich, P., R. Lahue. 1996. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem.* 65: 101-33
155. Monson, R. R., L. J. Fine. 1978. Cancer mortality and morbidity among rubber workers. *J Natl Cancer Inst.* 61: 1047-53.



156. Mutnick, A., J. E. Muscat. 1997. Primary brain cancer in adults and the use of common household appliances: a case-control study. *Rev Environ Health*. 12: 59-62.
157. Nagashima, G., R. Suzuki, H. Hokaku, M. Takahashi, T. Miyo, J. Asai, N. Nakagawa, T. Fujimoto. 1999. Graphic analysis of microscopic tumor cell infiltration, proliferative potential, and vascular endothelial growth factor expression in an autopsy brain with glioblastoma. *Surg Neurol*. 51: 292-9.
158. Nehme, A., R. Baskaran, S. Aebi, D. Fink, S. Nebel, B. Cenni, J. Y. Wang, S. B. Howell, R. D. Christen. 1997. Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. *Cancer Res*. 57: 3253-7.
159. Newcomb, E. W., W. J. Madonia, S. Pisharody, F. F. Lang, M. Koslow, D. C. Miller. 1993. A correlative study of p53 protein alteration and p53 gene mutation in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol*. 3: 229-35.
160. Nicolaides, N. C., N. Papadopoulos, B. Liu, Y. F. Wei, K. C. Carter, S. M. Ruben, C. A. Rosen, W. A. Haseltine, R. D. Fleischmann, C. M. Fraser, et al. 1994. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 371: 75-80.
161. Nieder, C., S. Petersen, C. Petersen, H. D. Thames. 2000. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in gliomas. *Cancer Treat Rev*. 26: 67-73.
162. Nierenberg, D., R. Harbaugh, L. H. Maurer, T. Reeder, G. Scott, J. Fratkin, E. Newman. 1991. Continuous intratumoral infusion of methotrexate for recurrent glioblastoma: a pilot study. *Neurosurgery*. 28: 752-61.
163. Nikkhah, G., J. C. Tonn, O. Hoffmann, H. P. Kraemer, J. L. Darling, R. Schonmayr, W. Schachenmayr. 1992. The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system. Part I: Evaluation of test-specific variables. *J Neurooncol*. 13: 1-11.
164. Nikkhah, G., J. C. Tonn, O. Hoffmann, H. P. Kraemer, J. L. Darling, W. Schachenmayr, R. Schonmayr. 1992. The MTT assay for

- chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system. Part II: Evaluation of patient- and drug-specific variables. *J Neurooncol.* 13: 13-24.
165. O'Donovan, M. C., P. J. Oefner, S. C. Roberts, J. Austin, B. Hoogendoorn, C. Guy, G. Speight, M. Upadhyaya, S. S. Sommer, P. McGuffin. 1998. Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics.* 52: 44-9.
  166. Ohgaki, H., R. H. Eibl, O. D. Wiestler, M. G. Yasargil, E. W. Newcomb, P. Kleihues. 1991. p53 mutations in nonastrocytic human brain tumors. *Cancer Res.* 51: 6202-5.
  167. Ohgaki, H., R. H. Eibl, M. Schwab, M. B. Reichel, L. Mariani, M. Gehring, I. Petersen, T. Holl, O. D. Wiestler, P. Kleihues. 1993. Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinog.* 8: 74-80
  168. Olin, G. R., A. Ahlbom. 1980. The cancer mortality among Swedish chemists graduated during three decades. A comparison with the general population and with a cohort of architects. *Environ Res.* 22: 154-61.
  169. Olsen, J. H., J. D. Boice, Jr., J. P. Jensen, J. F. Fraumeni, Jr. 1989. Cancer among epileptic patients exposed to anticonvulsant drugs. *J Natl Cancer Inst.* 81: 803-8.
  170. Palombo, F., P. Gallinari, I. Iaccarino, T. Lettieri, M. Hughes, A. D'Arrigo, O. Truong, J. J. Hsuan, J. Jiricny. 1995. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science.* 268: 1912-4.
  171. Papadopoulos, N., N. C. Nicolaides, Y. F. Wei, S. M. Ruben, K. C. Carter, C. A. Rosen, W. A. Haseltine, R. D. Fleischmann, C. M. Fraser, M. D. Adams, et al. 1994. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science.* 263: 1625-9.
  172. Papadopoulos, N., N. C. Nicolaides, B. Liu, R. Parsons, C. Lengauer, F. Palombo, A. D'Arrigo, S. Markowitz, J. K. Willson, K. W. Kinzler, et al. 1995. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science.* 268: 1915-7.

173. Paquis-Flucklinger, V., S. Santucci-Darmanin, R. Paul, A. Saunieres, C. Turc-Carel, C. Desnuelle. 1997. Cloning and expression analysis of a meiosis-specific MutS homolog: the human MSH4 gene. *Genomics*. 44: 188-94.
174. Patronas, N. J., G. Di Chiro, C. Kufra, D. Bairamian, P. L. Kornblith, R. Simon, S. M. Larson. 1985. Prediction of survival in glioma patients by means of positron emission tomography. *J Neurosurg*. 62: 816-22.
175. Polednak, A. P., J. T. Flannery. 1995. Brain, other central nervous system, and eye cancer. *Cancer*. 75: 330-7.
176. Prados, M. D., C. Scott, W. J. Curran, Jr., D. F. Nelson, S. Leibel, S. Kramer. 1999. Procarbazine, lomustine, and vincristine (PCV) chemotherapy for anaplastic astrocytoma: A retrospective review of radiation therapy oncology group protocols comparing survival with carmustine or PCV adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 17: 3389-95.
177. Prados, M. D., V. Levin. 2000. Biology and treatment of malignant glioma. *Semin Oncol*. 27: 1-10.
178. Preston-Martin, S., S. Lewis, R. Winkelmann, B. Borman, J. Auld, N. Pearce. 1993. Descriptive epidemiology of primary cancer of the brain, cranial nerves, and cranial meninges in New Zealand, 1948-88. *Cancer Causes Control*. 4: 529-38.
179. Preston-Martin, S., J. M. Pogoda, B. Schlehofer, M. Blettner, G. R. Howe, P. Ryan, F. Menegoz, G. G. Giles, Y. Rodvall, N. W. Choi, J. Little, A. Arslan. 1998. An international case-control study of adult glioma and meningioma: the role of head trauma. *Int J Epidemiol*. 27: 579-86.
180. Preuss, I., R. Thust, B. Kaina. 1996. Protective effect of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) on the cytotoxic and recombinogenic activity of different antineoplastic drugs. *Int J Cancer*. 65: 506-12.
181. Prokocimer, M., M. Shaklai, H. B. Bassat, D. Wolf, N. Goldfinger, V. Rotter. 1986. Expression of p53 in human leukemia and lymphoma. *Blood*. 68: 113-8.

182. Radhakrishnan, K., B. Mokri, J. E. Parisi, W. M. O'Fallon, J. Sunku, L. T. Kurland. 1995. The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. *Ann Neurol.* 37: 67-73.
183. Rampino, N., H. Yamamoto, Y. Ionov, Y. Li, H. Sawai, J. C. Reed, M. Perucho. 1997. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science.* 275: 967-9.
184. Ransohoff, J., B. F. Martin, T. J. Medrek, M. N. Harris, F. M. Golomb, J. C. Wright. 1965. Preliminary clinical study of mithramycin (nsc-24559) in primary tumors of the central nervous system. *Cancer Chemother Rep.* 49: 51-7.
185. Rasheed, B. K., G. N. Fuller, A. H. Friedman, D. D. Bigner, S. H. Bigner. 1992. Loss of heterozygosity for 10q loci in human gliomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 5: 75-82.
186. Rasheed, B. K., R. E. McLendon, J. E. Herndon, H. S. Friedman, A. H. Friedman, D. D. Bigner, S. H. Bigner. 1994. Alterations of the TP53 gene in human gliomas. *Cancer Res.* 54: 1324-30.
187. Rasheed, B. K., T. T. Stenzel, R. E. McLendon, R. Parsons, A. H. Friedman, H. S. Friedman, D. D. Bigner, S. H. Bigner. 1997. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res.* 57: 4187-90.
188. Rasheed, B. K., R. N. Wiltshire, S. H. Bigner, D. D. Bigner. 1999. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol.* 11: 162-7.
189. Reenan, R. A., R. D. Kolodner. 1992. Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins. *Genetics.* 132: 963-73.
190. Reifenberger, G., L. Liu, K. Ichimura, E. E. Schmidt, V. P. Collins. 1993. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res.* 53: 2736-9.
191. Reifenberger, G., J. Reifenberger, K. Ichimura, P. S. Meltzer, V. P. Collins. 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: 4299-303.
192. Reifenberger, G., K. Ichimura, J. Reifenberger, A. G. Elkahloun, P. S. Meltzer, V. P. Collins. 1996. Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res.* 56: 5141-5.
  193. Reifenberger, J., G. U. Ring, U. Gies, L. Cobbers, J. Oberstrass, H. X. An, D. Niederacher, W. Wechsler, G. Reifenberger. 1996. Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55: 822-31.
  194. Rhyu, M. S. 1996. Molecular mechanisms underlying hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 88: 240-51.
  195. Robinette, C. D., Z. Hrubec, J. F. Fraumeni, Jr. 1979. Chronic alcoholism and subsequent mortality in World War II veterans. *Am J Epidemiol.* 109: 687-700.
  196. Rodvall, Y., A. Ahlbom, B. Spannare, G. Nise. 1996. Glioma and occupational exposure in Sweden, a case-control study. *Occup Environ Med.* 53: 526-37.
  197. Rodvall, Y., A. Ahlbom, C. Stenlund, S. Preston-Martin, T. Lindh, B. Spannare. 1998. Occupational exposure to magnetic fields and brain tumours in central Sweden. *Eur J Epidemiol.* 14: 563-9.
  198. Rodvall, Y., A. Ahlbom, G. Pershagen, M. Nylander, B. Spannare. 1998. Dental radiography after age 25 years, amalgam fillings and tumours of the central nervous system. *Oral Oncol.* 34: 265-9.
  199. Rosenblum, M. L., D. A. Vasquez, T. Hoshino, C. B. Wilson. 1978. Development of a clonogenic cell assay for human brain tumors. *Cancer.* 41: 2305-14.
  200. Rosenblum, M. L., M. A. Gerosa. 1984. Stem cell sensitivity. *Prog Exp Tumor Res.* 28: 1-17
  201. Roth, W., M. Weller. 1999. Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cell Mol Life Sci.* 56: 481-506.

202. Rovinski, B., S. Benchimol. 1988. Immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene*. 2: 445-52.
203. Saez, R. J., R. J. Campbell, E. R. Laws, Jr. 1977. Chemotherapeutic trials on human malignant astrocytomas in organ culture. *J Neurosurg*. 46: 320-7.
204. Sakas, D., N. Kalfakis, M. Panas, D. Vassilopoulos, P. Carvounis. 1994. The risk of cancer in relatives of patients with brain neoplasm. *Acta Neurochir*. 131: 226-8
205. Salzman, M. 1980. Survival in glioblastoma: historical perspective. *Neurosurgery*. 7: 435-9.
206. Salmon, S. E., A. W. Hamburger, B. Soehnlen, B. G. Durie, D. S. Alberts, T. E. Moon. 1978. Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N Engl J Med*. 298: 1321-7.
207. Salmon, S. E. 1984. Development and applications of a human tumor colony assay for chemosensitivity testing. *Recent Results Cancer Res*. 94: 8-16
208. Sancar, A., J. E. Hearst. 1993. Molecular matchmakers. *Science*. 259: 1415-20.
209. Sancar, A. 1994. Mechanisms of DNA excision repair. *Science*. 266: 1954-6.
210. Sauer, H. 1998. [Systemic cytostatic chemotherapy]. *Internist (Berl)*. 39: 1104-14.
211. Schlehofer, B., M. Blettner, S. Preston-Martin, D. Niehoff, J. Wahrendorf, A. Arslan, A. Ahlbom, W. N. Choi, G. G. Giles, G. R. Howe, J. Little, F. Menegoz, P. Ryan. 1999. Role of medical history in brain tumour development. Results from the international adult brain tumour study. *Int J Cancer*. 82: 155-60.
212. Schmidt, E. E., K. Ichimura, K. R. Messerle, H. M. Goike, V. P. Collins. 1997. Infrequent methylation of CDKN2A(MTS1/p16) and rare mutation of both CDKN2A and CDKN2B(MTS2/p15) in primary astrocytic tumours. *Br J Cancer*. 75: 2-8

213. Schuman, L. M., N. W. Choi, W. H. Gullen. 1967. Relationship of central nervous system neoplasms to *Toxoplasma gondii* infection. *Am J Public Health Nations Health*. 57: 848-56.
214. Scott, J. N., N. B. Rewcastle, P. M. Brasher, D. Fulton, N. A. Hagen, J. A. MacKinnon, G. Sutherland, J. G. Cairncross, P. Forsyth. 1998. Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study. *Can J Neurol Sci*. 25: 197-201.
215. Selby, P., R. N. Buick, I. Tannock. 1983. A critical appraisal of the "human tumor stem-cell assay". *N Engl J Med*. 308: 129-34.
216. Shapiro, W. R., W. A. Yung, G. A. Basler, J. R. Shapiro. 1981. Heterogeneous response to chemotherapy of human gliomas grown in nude mice and as clones in vitro. *Cancer Treat Rep*. 65: 55-9.
217. Shapiro, W. R. 1982. Treatment of neuroectodermal brain tumors. *Ann Neurol*. 12: 231-7.
218. Shapiro, W. R., J. R. Shapiro. 1986. Principles of brain tumor chemotherapy. *Semin Oncol*. 13: 56-69.
219. Shin, K. H., Y. M. Yang, J. G. Park. 1998. Absence or decreased levels of the hMLH1 protein in human gastric carcinoma cell lines: implication of hMLH1 in alkylation tolerance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 124: 421-6
220. Shore, R. E., R. E. Albert, B. S. Pasternack. 1976. Follow-up study of patients treated by X-ray epilation for *Tinea capitis*; resurvey of post-treatment illness and mortality experience. *Arch Environ Health*. 31: 21-8.
221. Smith, M. L., I. T. Chen, Q. Zhan, I. Bae, C. Y. Chen, T. M. Gilmer, M. B. Kastan, P. M. O'Connor, A. J. Fornace, Jr. 1994. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*. 266: 1376-80.
222. Souza, R. F., L. Garrigue-Antar, J. Lei, J. Yin, R. Appel, V. F. Vellucci, T. T. Zou, X. Zhou, S. Wang, M. G. Rhyu, K. Cymes, O. Chan, W. S. Park, M. J. Krasna, B. D. Greenwald, J. Cottrell, J. M. Abraham, L. Simms, B. Leggett, J. Young, N. Harpaz, M. Reiss, S. J. Meltzer. 1996. Alterations of transforming growth factor-beta 1 receptor type II occur in ulcerative colitis-associated carcinomas, sporadic colorectal

- neoplasms, and esophageal carcinomas, but not in gastric neoplasms. *Hum Cell.* 9: 229-36.
223. Steiner, H. H., C. Herold-Mende, M. Bonsanto, K. Geletneky, S. Kunze. 1998. [Prognosis of brain tumors: epidemiology, survival time and clinical course]. *Versicherungsmedizin.* 50: 173-9.
  224. Sunahara, M., A. Nakagawara. 2000. [Turcot syndrome]. *Nippon Rinsho.* 58: 1484-9.
  225. Swann, P. F., T. R. Waters, D. C. Moulton, Y. Z. Xu, Q. Zheng, M. Edwards, R. Mace. 1996. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science.* 273: 1109-11.
  226. Thomas, T. L., P. Decoufle, R. Moure-Eraso. 1980. Mortality among workers employed in petroleum refining and petrochemical plants. *J Occup Med.* 22: 97-103.
  227. Tonn, J. C., G. Nikkhah, J. L. Darling, W. Schachenmayr. 1993. Test for chemotherapeutic sensitivity of cerebral gliomas: use of the colorimetric MTT assay. *J Neurooncol.* 16: 177-80.
  228. Tonn, J. C., W. Schachenmayr, H. P. Kraemer. 1994. In vitro chemosensitivity test of malignant gliomas: clinical relevance of test results independent of adjuvant chemotherapy. *Anticancer Res.* 14: 1371-5.
  229. Trizna, Z., M. de Andrade, A. P. Kyritsis, K. Briggs, V. A. Levin, J. M. Bruner, Q. Wei, M. L. Bondy. 1998. Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase mu and theta, N-acetyltransferase, and CYP1A1 and risk of gliomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7: 553-5.
  230. Umar, A., A. B. Buermeyer, J. A. Simon, D. C. Thomas, A. B. Clark, R. M. Liskay, T. A. Kunkel. 1996. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell.* 87: 65-73.
  231. Unger, M., J. Olsen. 1980. Organochlorine compounds in the adipose tissue of deceased people with and without cancer. *Environ Res.* 23: 257-63.
  232. Urade, M., M. Sugi, T. Mima, T. Ogura, T. Matsuya. 1989. High induction of poly(ADP-ribose) polymerase activity in bleomycin-resistant HeLa cells. *Jpn J Cancer Res.* 80: 464-8.



233. Vaisman, A., M. Varchenko, A. Umar, T. A. Kunkel, J. I. Risinger, J. C. Barrett, T. C. Hamilton, S. G. Chaney. 1998. The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res.* 58: 3579-85.
234. Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits, J. L. Bos. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 319: 525-32.
235. von Deimling, A., R. H. Eibl, H. Ohgaki, D. N. Louis, K. von Ammon, I. Petersen, P. Kleihues, R. Y. Chung, O. D. Wiestler, B. R. Seizinger. 1992. p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. *Cancer Res.* 52: 2987-90.
236. von Deimling, A., K. von Ammon, D. Schoenfeld, O. D. Wiestler, B. R. Seizinger, D. N. Louis. 1993. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol.* 3: 19-26.
237. Walker, A. E., M. Robins, F. D. Weinfeld. 1985. Epidemiology of brain tumors: the national survey of intracranial neoplasms. *Neurology.* 35: 219-26.
238. Walker, P. R., C. Smith, T. Youdale, J. Leblanc, J. F. Whitfield, M. Sikorska. 1991. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res.* 51: 1078-85.
239. Walter, A. W., M. L. Hancock, C. H. Pui, M. M. Hudson, J. S. Ochs, G. K. Rivera, C. B. Pratt, J. M. Boyett, L. E. Kun. 1998. Secondary brain tumors in children treated for acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *J Clin Oncol.* 16: 3761-7.
240. Warnick, C. T., B. Dabbas, C. D. Ford, K. A. Strait. 2001. Identification of a p53 response element in the promoter region of the hMSH2 gene required for expression in A2780 ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 276: 27363-70.
241. Watanabe, K., O. Tachibana, K. Sata, Y. Yonekawa, P. Kleihues, H. Ohgaki. 1996. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 6: 217-23; discussion 23-4.

242. Waters, T. R., P. F. Swann. 1997. Cytotoxic mechanism of 6-thioguanine: hMutSalpha, the human mismatch binding heterodimer, binds to DNA containing S6-methylthioguanine. *Biochemistry*. 36: 2501-6.
243. Wei, Q., M. L. Bondy, L. Mao, Y. Gaun, L. Cheng, J. Cunningham, Y. Fan, J. M. Bruner, W. K. Yung, V. A. Levin, A. P. Kyritsis. 1997. Reduced expression of mismatch repair genes measured by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction in human gliomas. *Cancer Res*. 57: 1673-7.
244. Werner, M. H., S. Phuphanich, G. H. Lyman. 1995. Increasing Incidence of Primary Brain Tumors in the Elderly in Florida. *Cancer Control*. 2: 309-314.
245. Werner, M. H., S. Phuphanich, G. H. Lyman. 1995. The increasing incidence of malignant gliomas and primary central nervous system lymphoma in the elderly. *Cancer*. 76: 1634-42.
246. Wiestler, O., P. Kleihues, A. E. Pegg. 1984. O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human brain and brain tumors. *Carcinogenesis*. 5: 121-4.
247. Wildenberg, J., M. Meselson. 1975. Mismatch repair in heteroduplex DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72: 2202-6.
248. Wolff, J. E., T. Trilling, G. Molenkamp, R. M. Egeler, H. Jurgens. 1999. Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a meta analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 125: 481-6.
249. Wooster, R., A. M. Cleton-Jansen, N. Collins, J. Mangion, R. S. Cornelis, C. S. Cooper, B. A. Gusterson, B. A. Ponder, A. von Deimling, O. D. Wiestler, et al. 1994. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet*. 6: 152-6.
250. Wrensch, M., A. Weinberg, J. Wiencke, H. Masters, R. Miike, G. Barger, M. Lee. 1997. Does prior infection with varicella-zoster virus influence risk of adult glioma? *Am J Epidemiol*. 145: 594-7.
251. Wrensch, M., R. Miike, M. Lee, J. Neuhaus. 2000. Are prior head injuries or diagnostic X-rays associated with glioma in adults? The effects of control selection bias. *Neuroepidemiology*. 19: 234-44.

252. Wrensch, M., A. Weinberg, J. Wiencke, R. Miike, G. Barger, K. Kelsey. 2001. Prevalence of antibodies to four herpesviruses among adults with glioma and controls. *Am J Epidemiol.* 154: 161-5.
253. Yin, Y., M. A. Tainsky, F. Z. Bischoff, L. C. Strong, G. M. Wahl. 1992. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell.* 70: 937-48.
254. Yung, W. K., J. R. Shapiro, W. R. Shapiro. 1982. Heterogeneous chemosensitivities of subpopulations of human glioma cells in culture. *Cancer Res.* 42: 992-8.
255. Yung, W. K., M. D. Prados, R. Yaya-Tur, S. S. Rosenfeld, M. Brada, H. S. Friedman, R. Albright, J. Olson, S. M. Chang, A. M. O'Neill, A. H. Friedman, J. Bruner, N. Yue, M. Dugan, S. Zaknoen, V. A. Levin. 1999. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. *J Clin Oncol.* 17: 2762-71.
256. Zampieri, P., F. Meneghini, F. Grigoletto, M. Gerosa, C. Licata, L. Casentini, P. L. Longatti, A. Padoan, S. Mingrino. 1994. Risk factors for cerebral glioma in adults: a case-control study in an Italian population. *J Neurooncol.* 19: 61-7
257. Zhu, J., S. Z. Guo, A. H. Beggs, T. Maruyama, T. Santarius, K. Dashner, N. Olsen, J. K. Wu, P. Black. 1996. Microsatellite instability analysis of primary human brain tumors. *Oncogene.* 12: 1417-23.
258. Zulch, K. J. 1980. Principles of the new World Health Organization (WHO) classification of brain tumors. *Neuroradiology.* 19: 59-66

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Prof. Dr. Arnold	Prof. Dr. Koolman
Prof. Dr. Aumüller	Prof. Dr. Krieg
Prof. Dr. Barth	Prof. Dr. Lang
Prof. Dr. Dr. Basler	Prof. Dr. Lennartz
Prof. Dr. Baum	Prof. Dr. Oertel
PD Dr. Christiansen	Prof. Dr. Remschmidt
Prof. Dr. Dr. Daut	Prof. Dr. Schachtschabel
Prof. Dr. Engel	Prof. Dr. Schulz
Prof. Dr. Geus	Prof. Dr. Seifart
Prof. Dr. Griss	Prof. Dr. Steininger
Prof. Dr. Happle	PD Dr. Stinner
PD Dr. Hesse	PD Dr. Vohland
Prof. Dr. Kälble	Prof. Dr. Werner
Prof. Dr. Kern	PD Dr. Westermann

Meine akademischen Lehrer in Gießen waren:

Prof. Dr. Grimm  
Prof. Dr. Kaps  
Prof. Dr. Seeger

## **Danksagung**

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Jürgen Schlegel, der mir jederzeit und in jeder Situation nicht nur mit einer ausgezeichneten fachlichen Beratung sondern auch mit eigenem Einsatz, sowohl bei fachlichen als auch bei organisatorischen Problemen, zur Seite stand. Jürgen Schlegel motivierte mich und die gesamte Arbeitsgruppe zu wissenschaftlichem Denken und vermittelte mir nicht zuletzt dadurch viel Spass an wissenschaftlicher Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Guido Piontek, der mir mich vor allem bei der praktischen Arbeit im Labor hervorragend unterstützt hat und durch den mir die experimentelle Arbeit große Freude bereitet hat. Besonders möchte ich mich darüber hinaus bei Herrn PD Dr. Kuchelmeister, bei Herrn Prof. Dr. Schachenmayr und bei Frau Rötering aus dem Institut für Neuropathologie der Justus Liebig Universität Gießen für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meiner Familie, vor allem meinen Eltern Ursula und August Rellecke, denn nur durch sie waren mir die besten vorstellbaren Bedingungen für das Studium und die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit gegeben.