

Kristin Margarete Johanna Münkel  
Dr. med.

## **Charakterisierung des *TP53* - Signalweges an klinisch - molekularbiologisch definierten Glioblastom - Subtypen**

Geboren am 16. 07. 1966 in Karlsruhe  
Reifeprüfung am 11. 06. 1985 in Karlsruhe  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 85/86 bis WS 93/94  
Physikum am 17. 08. 1988 an der Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Houston (USA) und Heidelberg  
Staatsexamen am 22.11. 1993 an der Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg

Promotionsfach: Neurochirurgie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. S. Kunze

Das Glioblastom weist trotz multimodaler Therapieformen eine infauste Prognose mit mittleren Überlebenszeiten von weniger als 12 Monaten auf. Detailliertere Erkenntnisse zur Struktur von Glioblastom - Subgruppen bergen die Hoffnung auf gezielte und individualisierte Therapiestrategien. Glioblastome können sowohl klinisch – anamnestisch als auch molekulargenetisch in mindestens zwei Subgruppen – primäre und sekundäre Glioblastome - unterteilt werden. Sekundäre Glioblastome weisen hauptsächlich Mutationen des *TP53* – Gens auf, während primäre Glioblastome in nur wenigen Fällen *TP53* – Veränderungen zeigen. Letztere sind dagegen vorwiegend durch eine Amplifikation und Überexpression des *EGF-R* – Gens und eine Deletion von Chromosom 10 gekennzeichnet. Die Untersuchung des *TP53* – Signalweges bei primären Glioblastomen, die trotz eines intakten *TP53* – Gens einen offensichtlichen Defekt aufweisen, wurde in Beziehung zu der der sekundären Glioblastomen gesetzt. Die Subklassifizierung anhand von *TP53* – Mutationen allein ist jedoch umstritten. Sie wurde daher in der vorliegenden Arbeit in einen funktionellen Zusammenhang mit *TP53* – Regulatoren (*ATM* und *HDM-2*) als auch *TP53* - Effektoren auf Reparaturebene ( $p21^{WAF1/Cip1}$  und *gadd45*) und Apoptoseebene (*bax*, *bcl-x<sub>L</sub>* und *bcl-2*) gebracht. Die Überprüfung einer Subklassifizierung der untersuchten glialen Tumore in klinisch – molekularbiologischer Hinsicht, als auch die Charakterisierung der Tumoren anhand des *TP53* – Signalweges, stellte das Ziel der durchgeführten Untersuchungen dar. Die Entwicklung eines Primärzellkulturmodells diente dabei als Basis. Klinisch konnten die 32 untersuchten Tumore in 17 primäre und 13 sekundäre Glioblastome sowie 2 Mischgliome subgruppiert werden. Sekundäre Glioblastome zeigten eine signifikant verlängerte Anamnesedauer, Überlebenszeit und progressionsfreies Intervall. Zusätzlich wiesen sie ein deutlich niedrigeres mittleres Erkrankungsalter und einen günstigeren KPS auf. Ein Zusammenhang des KPS mit einer längeren Überlebenszeit bestand nicht. Die Beurteilung der tumorbezogenen Einflussfaktoren ergab ein Überwiegen der Epilepsie als Erstsymptom bei sekundären Glioblastomen. Eine Prädominanz der Tumorlokalisation war nicht festzustellen. Primäre Glioblastome konnten als besonders großvolumige Tumore bei vorwiegend ischämisch - nekrotischem Aspekt identifiziert werden. Bezüglich der therapiebezogenen Einflussfaktoren fiel ein größerer Resttumoranteil in der Gruppe der primären Glioblastome auf. Interessanterweise konnte im Rahmen der Rezidivoperationen von primären Glioblastompatienten eine Tendenz zu einer Verlängerung des rezidivfreien Intervalls und der Überlebenszeit im Vergleich zu sekundären Glioblastompatienten beobachtet werden. Mögliche weitere Subgruppierungen wurden für Gliome, die eine direkten

Tumorprogression vom Astrozytom WHO °II zum Glioblastom durchlaufen haben, für ein gemistozytisch – differenziertes malignisiertes Astrozytom und ein oligoastroglial – differenziertes Glioblastom diskutiert. Molekulargenetisch wurden 21 Gliomzellkulturen untersucht und in drei Gruppen unterteilt: 11 primäre „*de novo*“ Glioblastome (Gruppe 1), 3 sekundäre Glioblastome (Gruppe 2) und 5 Astrozytome mit histologisch – anamnestischer bzw. radiologisch – anamnestischer Malignisierung (Gruppe 2(A)) sowie 2 oligoastrozytäre Tumore (Gruppe 3). Das Vorliegen einer *TP53* – Mutation konnte als Trenngröße zwischen primären und sekundären Glioblastomen bzw. Astrozytomen bestätigt werden. Trotz intakten *P53* – Gens bei primären Glioblastomen konnte in ca. 50 % der Fälle sowohl für primäre als auch sekundäre Glioblastome eine Stabilisierung des *p53* – Proteins nachgewiesen werden. Die Stabilisierung von *p53* durch eine Amplifikation des *HDM-2* – Gens oder von *mdm2* – Spleißvarianten wurde diskutiert. Als weiterer Regulator der *p53* – Protein – Stabilisierung wurde *ATM* von allen Glioblastomen kräftig exprimiert. Auffällig war eine schwache *ATM* – Expression bei 60 % der Astrozytomzellkulturen. Für 2/3 der sekundären Glioblastome war eine *p21<sup>WAF1/Cip1</sup>* - Überexpression bei fehlender *p53* – Proteinstabilisierung nachweisbar, was auf alternative Induktionswege für *p21<sup>WAF1/Cip1</sup>* schließen lässt. Für *gadd45* wurde sowohl die Möglichkeit einer Aktivierung als auch Inhibierung durch *p53* aufgezeigt. Für sekundäre Glioblastome wurde eine 20 % resp. 50 % höhere Expression von *p21<sup>WAF1/Cip1</sup>* bzw. *gadd45* im Vergleich zu primären Glioblastomen beobachtet, eine konkurrierende Situation beider Effektoren ist wahrscheinlich. Für den pro – apoptotischen Regulator *Bax* wurden sowohl eine zusätzliche anti – apoptotische Wirkung als auch *p53* – unabhängige Aktivierungswege in Erwägung gezogen. Die anti – apoptotischen Gene *Bcl-2* und *Bcl-x<sub>L</sub>* wurden von 80 % der primären Glioblastome überexprimiert, wohingegen bei sekundären Glioblastomen eine allgemein schwache Expression von *bcl-2* und in 40 % eine negative Expression von *bcl-x<sub>L</sub>* auffiel. Eine Korrelation der molekulargenetischen mit der klinischen Subgruppenstruktur war mittels Clusteranalyse für die primären Glioblastome und die Gruppe der Astrozytome tendenziell möglich. Die molekulargenetischen Trennungskriterien betrafen dabei neben Veränderungen des *TP53* – Gens das *HDM-2* – Gens, das *p53* – Protein und die *bcl-2* – Expression.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse die Möglichkeit einer klinisch – anamnestischen, aber auch einer molekularbiologisch basierten Subtypisierung von Glioblastomen in zwei Hauptgruppen. Die Mutation des *TP53* – Gens konnte als primär trennender Faktor identifiziert werden. Veränderungen des *p53* – Proteins – auch bei fehlender Genmutation – sowie des Regulatorgens *HDM-2* und der Effektoren auf Reparatur- und Apoptoseebene konnten ebenfalls zur Differenzierung der beiden Gruppen beitragen. Der Rückschluss von molekulargenetischen Parametern auf die klinisch definierten Subgruppen gelang statistisch nur begrenzt. Eine klare Definition von Glioblastomsubgruppen gemäß klinischer, histologischer und molekulargenetischer Parameter ist zu fordern, bedingt jedoch weitere Untersuchungen an größeren Patientengruppen sowie eine umfassende molekularbiologische Charakterisierung.