
Genética molecular de los astrocitomas
Molecular genetics of astrocytomas

J. Muñoz, X. Fan, M.M. Inda, J. Sáez-Castresana

RESUMEN

Los astrocitomas son el grupo de tumores intracraniales más frecuentes. De ellos, el glioblastoma es el más agresivo. En esta revisión nos centramos en describir las anomalías genéticas más frecuentes en astrocitomas. Para ello hacemos referencia a los genes del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) p53, p16, PTEN y DMBT1. Asimismo presentamos ciertos aspectos genéticos que influyen en la progresión tumoral hacia glioblastomas.

Palabras clave: Glioma. Astrocitoma. Glioblastoma. Genética. Progresión tumoral.

ABSTRACT

Astrocytomas are the most frequent group of intracranial tumours. Among them, glioblastoma is the most aggressive one. In this review we will describe the most common genetic abnormalities discovered in astrocytomas. We will refer to the epidermal growth factor receptor (EGFR), p53, p16, PTEN and DMBT1 genes. We will also present certain genetic aspects that influence the progression to glioblastoma.

Key words: Glioma. Astrocytoma. Glioblastoma. Genetics. Tumor progression.

ANALES Sis San Navarra 2000; 23 (2): 265-278.

Departamento de Genética. Universidad de Navarra. Pamplona

Este trabajo se ha realizado, en parte, gracias a las ayudas recibidas del Departamento de Salud del Gobierno de Navarra, Fondo de Investigación Sanitaria (ref. 99/1265), Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer y Fundación Universitaria de Navarra.

Aceptado para su publicación el 12 de abril de 2000.

Correspondencia

Javier Sáez-Castresana
Departamento de Genética
Universidad de Navarra
31008 Pamplona
Tfno. 948 425600 (ext. 6486)
Fax 948 425649
E-mail: jscastrsana@unav.es

INTRODUCCIÓN

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) constituyen aproximadamente el 1,4% del total, produciendo el 2,3% de las muertes directamente causadas por el cáncer. Este tipo de tumores afectan más frecuentemente a adultos mayores (18 por cada 100.000 habitantes al año) que a adolescentes o adultos jóvenes (2 por cada 100.000 habitantes al año). En EE.UU. se estima que se diagnostican unos 17.500 casos nuevos de tumores del SNC anualmente (más de 7 por cada 100.000 habitantes), sin incluir metástasis cerebrales.

A pesar del pequeño número de tumores cerebrales, en comparación con otros más frecuentes como tumores de colon, pulmón, o mama, entre otros, la morbilidad y mortalidad que causan en la población es altamente significativa. En los niños menores de 15 años, los tumores del SNC son, tras las leucemias, la segunda causa de muerte debida a cáncer. En varones entre 15 y 54 años de edad son la tercera causa de muerte por cáncer, y en mujeres entre 15 y 34 años de edad constituyen la cuarta causa de muerte debida a cáncer.

Dentro de los tumores cerebrales, los denominados gliomas son los más frecuentes, dividiéndose en astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas. En esta revisión se exponen las anomalías genéticas más típicas en los astrocitomas. Según la OMS¹, estos se dividen en: astrocitomas pilocíticos, (grado I de la OMS), astrocitomas (grado II), astrocitomas anaplásicos (grado III) y glioblastoma multiforme (grado IV). Los astrocitomas pilocíticos ocurren más frecuentemente en niños y es muy importante diferenciarlos de los

astrocitomas fibrilares difusos, debido al pronóstico favorable asociado a los astrocitomas pilocíticos. Ello se debe a la falta de infiltración tumoral al parénquima cerebral, a la facilidad de su resección y a su crecimiento lento.

TIPOS DE GLIOBLASTOMAS

Los glioblastomas constituyen el tipo de neoplasia más frecuente y maligno del grupo de tumores cerebrales. Se presenta con una frecuencia de 2 a 3 casos nuevos anuales por cada 100.000 habitantes, en la mayor parte de los países europeos y EE.UU. Existen dos formas de presentación de los glioblastomas: por una parte, los denominados glioblastomas primarios o *de novo*, que se desarrollan más rápidamente, con una historia clínica de corta duración, y en segundo lugar los glioblastomas secundarios, desarrollados mediante progresión tumoral a partir de astrocitomas de bajo grado (grado II de la OMS), o anaplásicos (grado III de la OMS). Existe una evidencia creciente de que estos subtipos de glioblastomas constituyen dos entidades clínicas diferentes, que se manifiestan en pacientes de edad diferente y se desarrollan mediante rutas genéticas distintas. Los glioblastomas primarios se presentan en pacientes de mayor edad y se caracterizan por la presentación de amplificación/sobreexpresión de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), mutaciones de PTEN, deleciones de p16 o sobreexpresión de MDM2, mientras que los glioblastomas secundarios se presentan en pacientes más jóvenes y contienen mutaciones de p53 como característica genética preponderante, aunque no exclusiva^{2,3} (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Datos clínicos y genéticos que diferencian los dos subtipos de glioblastomas.

	Glioblastoma primario (de novo)	Glioblastoma secundario
Edad media al diagnóstico	56 años	40 años
Historia clínica prequirúrgica	1,7 meses	53 m (desde astrocitoma II) 25 m (desde astrocitoma III)
Mutaciones de p53	11%	67%
Mutaciones de PTEN	32%	4%
Deleciones homocigóticas de p16	36%	4%
Amplificación de EGFR	39%	0%

Tabla 2. Ruta genética demostrable en la progresión tumoral de astrocitoma de bajo grado a glioblastoma secundario.

	Astrocitoma de bajo grado (grado II)	Astrocitoma anaplásico (grado III)	Glioblastoma secundario (grado IV)
Mutaciones de p53	+	+	+
Deleciones en 19q	-	+	+
Deleciones en 10q	-	-	+

PROGRESIÓN TUMORAL

En la progresión de los astrocitomas hacia mayores grados de malignidad se producen una serie de cambios fenotípicos difusos, continuos en el tiempo, que suelen ser un aumento en el grado de atipia nuclear y de actividad mitótica. Difieren de los glioblastomas multiformes, principalmente, porque en estos últimos es frecuente la aparición de focos necróticos y proliferación microvascular (angiogénesis).

Sin embargo, algunas biopsias muestran ocasionalmente una transición brusca a glioblastoma^{4,5}, de forma que aparecen focos bien delimitados que muestran un aumento de actividad mitótica y ausencia completa de expresión de GFAP. Tales focos se asemejan al fenómeno carcinomadenadenoma, descrito en hepatocarcinogénesis experimental y en tumores hepáticos humanos⁶. Probablemente se deben a la adquisición de una alteración genética adicional.

EGFR

Los factores de crecimiento pertenecen a una familia de polipéptidos que se unen a sus correspondientes receptores y estimulan la proliferación y diferenciación celular tanto en las células normales como en las malignas. Uno de los receptores de factores de crecimiento cuya unión a su ligando específico lleva a la proliferación celular es el EGFR cuyo gen se encuentra en el cromosoma 7 en la región 7p12.

El producto del gen del EGFR es un polipéptido constituido por 1.186 aminoácidos y cuyo peso molecular es de 170 kDa y su producto se expresa en la superficie celular de la mayoría de las células. La proteína consta de tres dominios:

- Dominio extracelular de unión al ligando que está constituido por cuatro subdominios, de los cuales el dominio III es el responsable de la unión al ligando.

- Dominio transmembrana que contiene una secuencia de carácter hidrofóbico gracias a la cual atraviesa la membrana.

- Dominio intracelular en el que reside la actividad tirosín kinasa del receptor y que también es el encargado de la regulación negativa del receptor. Posee cinco sitios de autofosforilación, necesarios para la internalización del receptor tras la unión del ligando.

La unión del ligando al EGFR induce cambios conformacionales en el receptor activando la tirosín kinasa intracelular, y conduciendo a una autofosforilación necesaria para su actividad biológica. Los principales ligandos del EGFR son el factor de crecimiento epitelial (EGF) y el TGF- α . El EGF y el TGF- α son capaces de activar al EGFR por vía auto- o paracrina mientras permanecen unidos a la membrana⁷.

La autofosforilación del extremo C-terminal remueve un sustrato inhibidor y permite el acceso de otros sustratos celulares al dominio tirosín kinasa. La tirosín kinasa activada del EGFR fosforila a un amplio número de sustratos celulares entre los que se incluyen la fosfolipasa-C- γ (PLC- γ), MAPK (mitogen activated protein kinase) y GAP (ras GTPase-activating protein). La activación de la PLC- γ lleva a la liberación de Ca²⁺ de los compartimentos intracelulares y se genera diacilglicerol que activa a la proteínkinasa C (PKC) que es una serín/treonín kinasa que hace que el receptor se deslocalice. También Ras puede ser activada por la tirosín kinasa del EGFR y esto conduce a la proliferación celular y a la síntesis de DNA. En esta vía están incluidos un amplio número de fac-

tores de transcripción nucleares y otros factores proteicos. La tirosin kinasa también es la responsable de la progresión del ciclo celular de fase G1 a fase S⁷.

El complejo ligando-receptor activo es endocitado y degradado en los lisosomas o reciclado a la membrana plasmática. La endocitosis y degradación del receptor forman parte de la regulación negativa de la señal transducida por el EGFR. Para que el EGFR sea endocitado se requiere un dominio regulador en el extremo C-terminal de la región intracelular del receptor⁷.

EGFR EN ASTROCITOMAS

El gen del EGFR se encuentra amplificado en aproximadamente el 40% de los glioblastomas. En la mitad de los casos se dan reordenamientos del gen amplificado que dan lugar a un transcrito y proteínas aberrantes.

Se han descrito un gran número de deleciones del mRNA del EGFR en distintos tipos de neoplasias, entre las que se encuentran los glioblastomas. Las deleciones descritas se dan tanto en el dominio extracelular como en el intracelular, sin embargo no se han descrito deleciones en el dominio transmembrana o en el subdominio tirosin kinasa. La mayoría de estas deleciones se deben a una alteración del corte y empalme (splicing) del mRNA como resultado de reordenamientos génicos.

Los reordenamientos más frecuentes se dan en la región extracelular del receptor y se ha detectado la existencia de tres tipos diferentes de deleciones en este dominio extracelular del EGFR⁷:

- EGFRvI: consiste en una deleción total y tiene cierta semejanza a la oncoproteína v-erb-B. Está constitutivamente activa y no se puede regular a través del ligando. Este tipo de alteración ha sido observada en una línea celular derivada de un glioma humano maligno.

- EGFRvII: se ha descrito en gliomas con genes amplificados y/o reordenados y se caracteriza por una deleción de 83 aminoácidos en el subdominio IV. Este tipo de EGFR es capaz de transducir la señal de

proliferación celular de la misma forma que el EGFR sin alterar.

- EGFRvIII: es la más común en las neoplasias humanas y, por ello, la mejor descrita de las tres. Resulta de un reordenamiento intragénico que lleva a la sobreexpresión de transcritos que carecen de los exones 2-7 del gen (801 bp). A este receptor le faltan 267 aminoácidos del dominio externo, del aminoácido 6 al 273, y no es capaz de unirse al ligando dando lugar a una tirosin kinasa que está activa constitutivamente, por lo que se estimula la proliferación celular de forma independiente a la unión del ligando⁸. Este tipo de alteración se ha descrito en el 50% de los gliomas tanto de alto como de bajo grado y en otros tumores como meduloblastomas, carcinomas de mama, riñón, cervix, vejiga, ovario y pulmón. Esta deleción confiere capacidad tumorigénica a las células de glioma en la que la síntesis de DNA no está estimulada por los factores de crecimiento.

Las deleciones en el dominio citoplasmático o intracelular son menos frecuentes y están localizadas en el dominio inhibidor intracelular y en el regulador de Ca²⁺/internalizador. Todas las deleciones comienzan en el mismo punto, pero tienen distinta longitud. Este tipo de alteraciones dan lugar a un receptor constitutivamente activo que no es internalizado al perder secuencias necesarias para la regulación negativa tras la unión del ligando, por lo que no resulta difícil que se sobreexpresen en la membrana⁷. Se ha estudiado esta región 3' terminal⁹ y se ha realizado el mapa de los exones 22-26. Se vio que la mayoría de los reordenamientos resultan en la pérdida de las bases que codifican los exones 23-25. También se ha hallado que existen dos regiones ricas en CA en el intrón 25 que están asociadas a la inestabilidad genómica.

Un amplio número de tumores presentan un EGFR alterado o sobreexpresado que conlleva un crecimiento celular descontrolado y un fenotipo maligno. Al parecer, este tipo de alteración es un evento tardío en la progresión de los gliomas al igual que la pérdida del cromosoma 10. Se ha usado el EGFR como marcador de pronóstico, ya

que en algunos tumores se puede correlacionar su sobreexpresión con el mal pronóstico. Actualmente se está estudiando el empleo del EGFR como diana en la terapia génica contra el cáncer, mediante el uso de oligonucleótidos antisentido de EGFR envueltos en lipofectina para inhibir el crecimiento de las células de glioma¹⁰.

En los tumores cerebrales, la amplificación del gen EGFR es frecuente en gliomas, especialmente en los glioblastomas. Esta amplificación, como ya se ha mencionado anteriormente, se encuentra frecuentemente asociada con el reordenamiento génico.

Liu y col¹¹ detectaron amplificación de EGFR en un 49% de los glioblastomas estudiados, mientras que su frecuencia era mucho menor en los gliomas de grado III. También vieron que no existía correlación entre la incidencia de alteración del gen PTEN/MMAC1 y la de amplificación de EGFR, a pesar de que cabría esperar que se encontraran en distintos tumores por su efecto contrario.

Schwechheimer y col¹² estudiaron la amplificación y el reordenamiento del gen EGFR en glioblastomas. Hallaron sobreexpresión de la proteína en la gran mayoría de los casos (17 de 18 glioblastomas estudiados) viendo inmunotinción con anticuerpos frente a EGFR tanto en la membrana como en el citoplasma. En aproximadamente el 50% de los glioblastomas tenían amplificado el gen de EGFR, de los cuales en dos se identificó una delección de los exones 2-7 perdiéndose 801 bp del dominio externo de la proteína receptor (EGFRvIII) debido a un reordenamiento.

Se ha visto que la amplificación del EGFR¹³ es menos frecuente en glioblastomas pediátricos (10%) que en adultos (35%). Esto podría significar que existen diferencias en el patrón de alteraciones genéticas entre adultos y niños. Además, en adultos rara vez se encuentran p53 alterado y sobreexpresión de EGFR, mientras que en niños sí que se suele encontrar. Todo ello sugiere distintas vías de génesis de este tipo de tumores en niños y adultos.

Goike y col¹⁴ estudiaron los reordenamientos en la región 3' del gen del EGFR.

Encontraron un fragmento aberrante de 4 kb que indicaba un reordenamiento del gen amplificado en la región que codifica para las bases 2801-3832. La secuenciación de este producto mostró una delección de 325 bases debida a la introducción de un codón stop entre las bases 3464-3466. La truncación se daba al final del dominio tirosín kinasa y resultaba en la pérdida de 228 aminoácidos terminales. Este receptor carecía de las cinco tirosinas que se autofosforilan necesarias para finalizar la señalización proteica.

Hunter y col¹⁵ estudiaron 43 gliomas entre los que se encontraban 30 glioblastomas, 7 astrocitomas anaplásicos, 3 astrocitomas de bajo grado, 2 ependimomas y un oligodendroglioma. Observaron que la amplificación de los genes EGFR y MDM2 se hallaba limitada al grupo de los glioblastomas, presentándose con una frecuencia del 40% y 10% respectivamente.

Biernat y col¹⁶ vieron que la alteración más frecuente en astrocitomas era la amplificación del gen EGFR, hallándola con una frecuencia del 45% de los casos. Sugawa y col¹⁰ sugirieron que el EGFR aberrante afecta a la malignidad del glioma debido a su capacidad de estimular la proliferación celular y de inhibir la apoptosis.

p53

La proteína p53 juega un papel crucial en el control del ciclo celular. El gen que la codifica se sitúa en el cromosoma 17p, y tiene 20 kb repartidas en un total de 11 exones, de los cuales el primero no codifica para la proteína. Dicha proteína consta de 393 aminoácidos, y su peso molecular es de 53 kDa^{17,18}.

La proteína p53 presenta un tiempo de vida media muy corto (entre seis y veinte minutos). Como monómero, es una proteína inactiva, que ha de formar tetrámeros para poder actuar. Básicamente, su función es la de un factor de transcripción capaz de activar la transcripción de distintos genes fundamentales en el control del ciclo celular^{17,18}.

Esta proteína responde a señales de daño al DNA, ante las que detiene la progresión en el ciclo celular de dos maneras^{17,18}:

- Deteniendo el ciclo celular en la fase G1, cuando el daño al DNA es pequeño y puede ser reparado. En este caso, p53 impediría la división celular ante la presencia de alteraciones en las hebras de DNA que podrían suponer el inicio del desarrollo de un tumor. Durante esta parada del ciclo, son activados los sistemas de reparación del DNA, que detectan la alteración y la eliminan, pudiendo entonces la célula continuar en su ciclo de división.

- Promoviendo la muerte celular programada, cuando el daño en el genoma es irreversible.

Hasta el momento, se conocen seis genes activados por p53¹⁷: p21 (Waf 1, Cip 1), MDM2, GADD45, Ciclina G1, Bax, IGF-BP3.

La proteína MDM2 se une a p53 inhibiendo su actividad. Es una forma de regulación por el producto, feed-back o retroalimentación. Se ha encontrado amplificación o sobreexpresión de MDM2 en muchos procesos cancerosos^{17,18}.

p53 activa la expresión de p21 y GADD45 cuando el daño al DNA es detectado en la fase G1^{17,18}.

El ciclo de división celular consta de cuatro fases sucesivas: una fase de síntesis de DNA, o fase S; otra de división celular, mitosis o fase M; y dos fases de transición, una fase G1 entre las fases M y S, y otra G2 entre S y M²⁰. La progresión en el ciclo celular responde a señales tanto de regulación positiva como de regulación negativa. Las moléculas que inducen la progresión en el ciclo pueden considerarse oncogenes, puesto que su sobreexpresión puede llevar a la célula a una proliferación incontrolada y, por tanto, a la formación de un tumor. Estas moléculas son, principalmente, las ciclinas y las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs)^{20,21}, moléculas que forman complejos que fosforilan otras proteínas de forma que el ciclo de división pueda continuar. En cambio, las moléculas que regulan negativamente el ciclo celular pueden considerarse genes supresores de tumores, puesto que un déficit en éstas puede tener las mismas consecuencias que la sobreexpresión de un oncogén^{20,21}.

Al final de la fase G1, los factores de transcripción de la familia E2F, que promueven el paso a la fase S del ciclo, permanecen acoplados con la proteína Rb (retinoblastoma, un supresor tumoral), y por lo tanto, inactivos. Estos factores son liberados cuando Rb es fosforilado por el complejo ciclina D1/CDK4 y, por lo tanto, se activarán todos aquellos genes necesarios para la entrada en la fase S y la progresión en el ciclo celular. p21 responde a la señal activadora de p53 inhibiendo la actividad de los complejos ciclina/CDK, de manera que Rb no es fosforilado, permanece activo y retiene los factores E2F, impidiendo, por tanto, que prosiga el ciclo celular^{20,22}.

GADD45 es una proteína capaz de unir e inhibir la actividad de otra, el PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular), que forma parte del complejo proteico implicado en la replicación del DNA. La expresión de GADD45 es inducida por p53^{17,18}. Asimismo, p21 también es capaz de unir PCNA, inactivándolo, de forma que, entre ambas, contribuyen a la detención del ciclo celular en una fase quiescente, o G0¹⁷.

p53 también es capaz de llevar a la célula hacia la apoptosis cuando el daño en el DNA es irreparable. Ello puede realizarlo induciendo la expresión de dos proteínas: Bax e IGF-BP3 (Insulin Growing Factor-Binding Protein 3)¹⁷.

ALTERACIONES DE p53

Un 55% de los cánceres hasta hoy conocidos presentan mutaciones en ambos alelos de p53. Las mutaciones aparecen, principalmente, en los exones 5-8 del gen, recayendo un 93% de ellas en el dominio de unión al DNA (18,23). Un 85,6% son mutaciones puntuales (transversiones -cambio de una base púrica por otra pirimidínica, o viceversa-, y transiciones -cambio de una base púrica por otra púrica, o de una pirimidínica por otra pirimidínica-, un 8,1%, deleciones e inserciones, un 5,5 %, mutaciones sin sentido (que dan lugar a proteínas truncadas), y un 0,8%, mutaciones silenciosas (que no afectan a la secuencia aminoacídica de la proteína)^{18,23}.

En adultos, se han encontrado alteraciones de p53 en un 15% de astrocitomas de bajo grado, y en un 38% de astrocitomas de alto grado^{21,23}. En niños, en cambio, la frecuencia de alteraciones de p53 es mucho más baja, estando la proteína alterada en un 1 ó 2% del total de astrocitomas. Esto puede corresponderse con un mejor pronóstico de este tipo de tumores en los niños¹⁹.

El papel predictivo de las mutaciones de p53 en la progresión de gliomas es todavía poco claro. En un estudio reciente²⁴ se analizaron 144 biopsias de 67 pacientes con astrocitomas recidivantes, mediante SSCP y secuenciación directa. Se encontró que 46 de 67 pacientes (69%) tenían una mutación de p53 en, al menos, una biopsia. En 41 de éstos (89%), la mutación se presentaba en la primera biopsia, indicando que las mutaciones de p53 son eventos tempranos en la evolución de los astrocitomas difusos. En 3 tumores se encontraron mutaciones dobles de p53, y también aparecían en la primera biopsia. De 28 astrocitomas de bajo grado con una mutación de p53, 7 (25%) mostraron pérdida del alelo normal en la primera biopsia. El estado alélico continuó igual en el 95% de los casos, incluso si la recidiva tenía el mismo o mayor grado de malignidad. La progresión de astrocitomas de bajo grado a anaplásicos o glioblastomas se dio con similar frecuencia en las lesiones con o sin mutaciones de p53, indicando que esta alteración genética se asocia a recidiva tumoral, pero no es predictiva de progresión a un fenotipo más maligno. Sin embargo, el intervalo de tiempo en que se desarrolla la progresión tumoral es más corto en los pacientes con astrocitomas de bajo grado que llevan una mutación de p53.

Otro trabajo²⁵ analizó 15 astrocitomas de bajo grado que progresaron a astrocitomas de alto grado, examinando el estado del gen p53 en los tumores primarios y en las recidivas. También se estudiaron las relaciones entre el estado de p53, a nivel de mutación y expresión, y grado tumoral. Ocho de los 15 tumores (53%) tenían mutaciones de p53. Nueve de 14 (64%) mostraron inmunotinción positiva inicialmente, y 8 de éstos también fueron inmunopositivos en las recidivas. Los tumores de bajo

grado que recidivaban como astrocitomas anaplásicos se caracterizaban por presentar mutaciones de p53 y ser inmunopositivos. Por el contrario, los tumores de bajo grado que recidivaban como glioblastomas, generalmente mantenían su p53 intacto y eran inmunonegativos. Esto indica que los astrocitomas de bajo grado destinados a evolucionar a grados más altos, lo hacen a través de dos vías clínicopatológicas: una, a astrocitomas anaplásicos y posteriormente a glioblastomas (p53 mutado), y otra, directamente a glioblastomas (p53 no mutado)

p16

La proteína p16 es codificada por el gen MTS1, también llamado CDKN2A, localizado en el cromosoma 9p. Este gen participa en la génesis de gliomas, melanomas, leucemias y cáncer de pulmón no microcítico²⁶. p16 actúa como un inhibidor de las kinasas dependientes de ciclinas del ciclo celular, en concreto de CDK4. La primera diana de los complejos ciclina D/CDK4, en G1, es la proteína Rb, proteína que sufre fosforilación progresiva en sus residuos de serina y treonina mientras las células desarrollan el ciclo celular. p16 regula negativamente al complejo ciclina D/CDK4, inhibiendo la fosforilación de Rb que este complejo lleva a cabo. La inhibición del ciclo celular mediante Rb se debe a que el Rb hipofosforilado (forma activa) se une al factor de transcripción E2F, inhibiendo la actividad de éste como factor de transcripción. El E2F activa los genes necesarios para la división celular. Por el contrario, Rb pasa a estado hiperfosforilado (forma inactiva) gracias a la acción del complejo ciclina D/CDK4, cuando éste no está sometido a inhibición por parte de p16. Es entonces cuando Rb se libera de E2F, y éste activa otros genes necesarios para la división celular. Por tanto, la pérdida de función de p16, a través de varios posibles mecanismos como son delección homocigótica, mutación, o hipermetilación de su promotor, inhibe la función de Rb al fosforilarse éste, y por tanto, la célula se introduce en un programa de crecimiento celular descontrolado, promoviendo la iniciación o progresión tumoral.

La pérdida de función de p16 ha sido ampliamente descrita en gliomas^{27,28}. Entre un 30 y un 40% de los GBMs primarios presentan deleciones de p16, dato que no ocurre en los GBMs secundarios. El grado de malignidad también parece tener relación con la frecuencia de deleción de p16, ya que los astrocitomas de bajo grado no presentan deleciones.

Nosotros presentamos resultados coincidentes respecto a las posibles alteraciones del gen p16 (resultados no publicados). En primer lugar p16 fue estudiado en 21 GBMs, no revelándose mutación alguna en sus 3 exones. Sin embargo, 6 GBMs de 21 (29%) presentaron deleciones homocigóticas de p16 (Fig. 1). También se demostró, mediante MSP (methylation specific PCR) que el promotor de p16 sufría hipermetilación en 2 de los 21 GBMs (9%) (Fig. 2). La hipermetilación de promotores es otro de los mecanismos que logra inactivar la expresión de un gen supresor de tumores. Hasta el momento hemos estudiado el gen p16 en 34 astrocitomas pediátricos de bajo grado, no habiéndose detectado mutaciones.

CROMOSOMA 10, PTEN Y DMBT1

La pérdida de heterocigosidad (LOH) en el cromosoma 10 es la lesión genética más frecuente en glioblastomas, presentándose aproximadamente en un 80% de los casos. La mayor parte de los glioblastomas han perdido una copia entera del cromosoma 10, mientras que existen tres loci en el cromosoma 10 que sufren deleciones en el resto de los casos, sugiriendo la presencia de genes supresores de tumores. Estas regiones corresponden a 10p14-pter en un 80% de los casos, 10q23-24 en un 80% de los casos, y 10q25-qter, en aproximadamente un 90% de los casos²⁹. Es posible que las deleciones parciales del cromosoma 10 sean típicas de los glioblastomas secundarios, mientras que las grandes deleciones y las deleciones completas del cromosoma 10 sean más exclusivas de los glioblastomas primarios.

PTEN

En 1997, dos grupos de investigación, del Columbia University Cancer Center y del

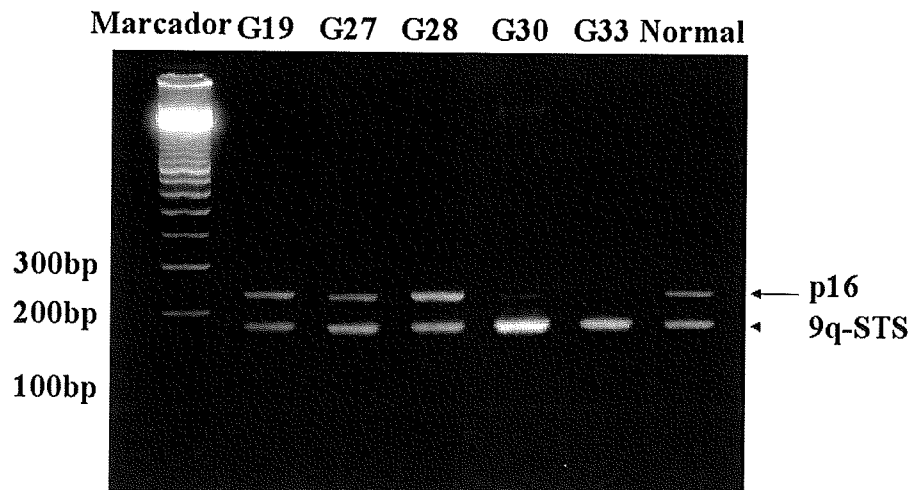


Figura 1. Deleción homocigótica de p16 demostrada en dos glioblastomas (G30 y G33). Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio tras ensayo de PCR diferencial para detectar deleción homocigótica de p16. Cada uno de los DNA extraídos de cinco glioblastomas y leucocitos de donantes sanos, muestra dos bandas: la superior corresponde a un fragmento del exón 2 del gen p16 de 235 pb, y la banda inferior corresponde a un fragmento de 180 pb de 9qSTS. Se consideró deleción homocigótica del exón 2 de p16 cuando la banda de STS que representa el DNA normal era 3 veces más intensa. Para la determinación del tamaño se incluyó en la primera calle un marcador con bandas de tamaño creciente en 100 pb (Pharmacia Biotech).

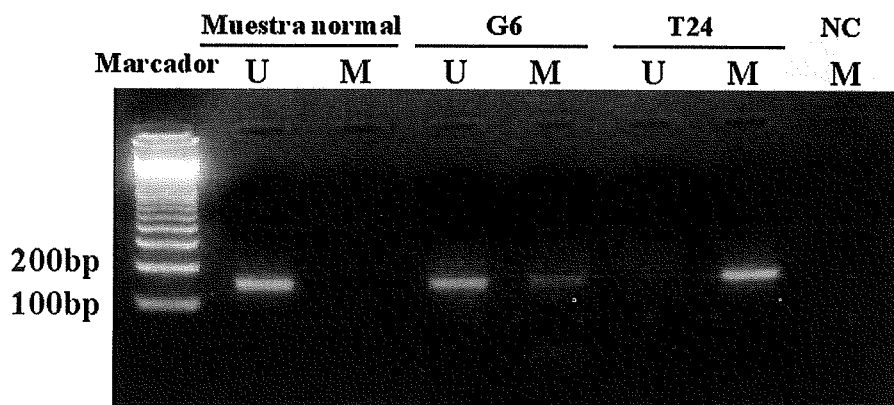


Figura 2. Inactivación de p16 por hipermetilación en un glioblastoma (G6). Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio tras ensayo de PCR diferencial para detectar regiones del promotor de p16 no metiladas (U) o metiladas (M). Muestra normal: DNA de leucocitos, usado como control positivo de promotor de p16 no metilado. El DNA de la línea celular T24 se usó como control positivo de metilación en p16. NC: PCR sin DNA, usado como control negativo de la reacción de PCR. Para la determinación del tamaño se incluyó en la primera calle un marcador con bandas de tamaño creciente en 100 pb (Pharmacia Biotech).

MD Anderson Cancer Center identificaron un nuevo gen supresor de tumores: PTEN/MMAC1 (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome ten/mutated in multiple advanced cancers 1)^{30,31}, cuya inactivación puede producir progresión maligna en tumores de mama, próstata y cerebro. Un poco más tarde otro grupo de la Universidad de Yale identificó el mismo gen al buscar fosfatasa de doble especificidad, denominándolo TEP-1 (TGF- β regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1)³². El gen PTEN se localiza en el locus cromosómico 10q23. Su cDNA codifica una proteína de 403 aminoácidos y 47kDa.

PTEN es una proteína citoplasmática observable mediante inmunofluorescencia^{33,34}. Hasta el momento el único hallazgo sobre la regulación de la expresión de PTEN es que el tratamiento con TGF- β lleva a una rápida caída (en dos horas) en la producción de mRNA de PTEN. PTEN, por ser una fosfatasa lipídica, actúa con su diana, el PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). PIP3 es un mensajero interno para ciertos estimuladores del crecimiento celular, como insulina y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). La unión de

estas moléculas a sus receptores de la membrana celular activa una enzima que genera PIP3 mediante la adición de un tercer fosfato a su predecesor, PIP2. PIP3 activa otras kinasas, y éstas hacen que la célula entre en el ciclo celular progresando en él, e impidiendo la iniciación del programa de apoptosis. PTEN, como fosfatasa que es, puede retirar el fosfato de PIP3, parándose así la señal de crecimiento celular³⁵.

Existen varios estudios que han investigado la frecuencia de mutaciones de PTEN en gliomas. Tales estudios muestran que PTEN sufre mutaciones/deleciones en un 44%, 28% ó 27% de los glioblastomas³⁶⁻³⁸. Parece que PTEN está mutado sólo en los gliomas de alto grado (grado III, astrocitomas anaplásicos; grado IV, glioblastomas). Posteriormente, Tohma y col³⁶ demostraron que la frecuencia de mutaciones de PTEN en glioblastomas que se desarrollaban clínicamente de novo (32%), era mayor que en los glioblastomas secundarios (4%) que se formaban a partir de astrocitomas grado II ó III. Más aún, Rasheed y col³⁷ demostraron que las mutaciones de PTEN se daban más frecuentemente en glioblastomas de adultos, pero no en

gliomas de bajo grado de adultos o en gliomas infantiles. No obstante, no existía una relación directa entre la presencia de mutaciones de PTEN y el pronóstico. Las mutaciones de PTEN eran más frecuentes en glioblastomas que en astrocitomas anaplásicos. Estos datos sugieren que las mutaciones de PTEN constituyen una alteración importante en el desarrollo de gliomas, pudiendo constituir un paso molecular necesario en la transformación de gliomas de bajo a alto grado.

A fin de identificar otras áreas del cromosoma 10 que pudieran contener genes supresores de tumores que participen en la progresión tumoral hacia glioblastomas secundarios, Fujisawa y col³⁸ estudiaron la posible pérdida de heterocigosidad (LOH) presentada por el cromosoma 10, mediante marcadores microsatélites (sondas muy polimórficas capaces de revelar los dos alelos de un locus cromosómico concreto -heterocigosidad-, mostrando si el tejido tumoral pierde uno de los alelos -LOH-, sospechándose así la existencia de un gen supresor de tumores a este nivel). En este estudio se escogieron piezas incluidas en parafina, que contenían, dentro del mismo bloque, áreas histológicamente diferentes, correspondientes a transiciones bruscas de astrocitoma de bajo grado o astrocitoma anaplásico a glioblastoma, lo cual sugiere la aparición de un segundo clon tumoral que, previsiblemente se ha desarrollado a partir del primer clon (menos maligno), tras adquirir algún cambio genético concreto. Se realizó microdissección de las áreas de alto grado (glioblastoma) y bajo grado (astrocitoma o astrocitoma anaplásico), y extracción del DNA. El resultado de este estudio muestra que la pérdida de un hipotético gen supresor de tumores en 10q25-qter es la alteración genética responsable de la adquisición del fenotipo de glioblastoma a partir de un astrocitoma de bajo grado o astrocitoma anaplásico.

Se ha demostrado también que PTEN tiene acción supresora tumoral, mediante transferencia de PTEN en adenovirus a células de glioma en cultivo, produciéndose una disminución en el nivel de proliferación y pérdida de la capacidad tumorigénica de esas células en ratones atímicos³⁹.

En resumen, PTEN es uno de los genes que sufre más frecuentemente alteraciones en cáncer humano, con una frecuencia que se aproxima a la de p53. El estudio de PTEN puede utilizarse como prueba diagnóstica para contribuir a la definición del grado de malignidad de los gliomas.

En el presente trabajo hemos estudiado la posible inactivación de PTEN en glioblastomas mediante mutaciones y delección homocigótica.

Los 9 exones del gen PTEN fueron amplificados mediante PCR y sometidos a SSCP para detectar posibles mutaciones en su secuencia. Se detectaron 5 mutaciones en un total de 22 GBMs (23%) (Fig. 3). También se analizaron las delecciones homocigóticas de PTEN mediante PCR diferencial. Se detectaron 3 delecciones homocigóticas entre los 22 GBMs (14%) (Fig. 4). Por tanto, concluimos que PTEN muestra alteraciones génicas (mutaciones o delecciones homocigóticas) en un 32% de GBMs (7 de 22 casos). Hasta el momento hemos estudiado las posibles mutaciones de PTEN en 34 astrocitomas pediátricos de bajo grado, no habiéndose demostrado ninguna mutación.

DMBT1

El gen DMBT1 (Deleted in Malignant Brain Tumors) fue estudiado por primera vez por Mollenhauer y col⁴⁰. Hasta entonces, se habían encontrado delecciones de la región distal del cromosoma 10 asociadas a cuadros clínicos de glioblastoma, y se había encontrado otro gen, PTEN^{30,31}, en esa misma zona, 10q23-24, que podía ser un posible gen supresor de tumores que apareciese delecionado en ese tipo de neoplasias. DMBT1 era un gen localizado en 10q25-26, entre los marcadores D10S209 y D10S587, muy próximo a PTEN.

Esta región cromosómica presentaba delecciones homocigóticas en una línea de meduloblastoma generada a partir de un cultivo primario de un paciente, y en dos líneas celulares de glioblastoma multiforme (GBM). Se vieron pérdidas de expresión del gen en un 80% de los tumores estudiados, delecciones homocigóticas del gen en un 25% de meduloblastomas, y pérdidas alélicas en un 59% de glioblastomas

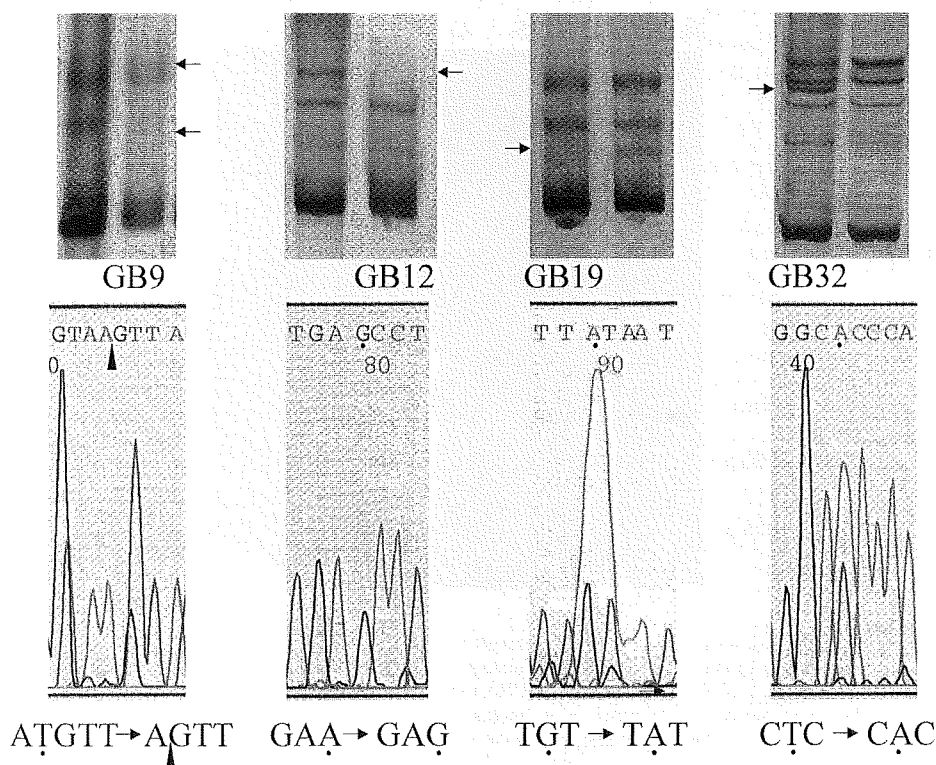


Figura 3. Análisis de mutaciones de PTEN en glioblastomas, mediante PCR-SSCP no isotópico (parte superior), y secuenciación automatizada (parte inferior).

analizados, de las cuales eran deleciones homocigóticas un 22%. En cambio, no encontraron ninguna alteración en los diez astrocitomas de bajo grado que estudiaron.

La proteína codificada por el gen DMBT1 tiene un total de 65 kb y 1.785 aminoácidos, y su peso molecular es de 196 kDa. Incluye un péptido líder N-terminal de 25 aminoácidos hidrofóbicos, lo que hace pensar que puede tratarse de una proteína que se secrete al espacio extracelular.

Presenta ocho dominios del tipo SRCR (Scavenger's Receptor Cysteine Rich, o Receptores Scavenger Ricos en Cisteína), separados por secuencias de entre 20 y 23 aminoácidos llamados secuencias SID (SRCR Interspersed Domains). Los dominios SRCR tienen 110 bp, y son ricos en cisteína,

que permiten catalogar al producto del gen DMBT1 como perteneciente a la superfamilia de receptores Scavenger. Un noveno dominio SRCR viene a estar flanqueado por dos dominios CUB (C1r/C1s Uegf Bmp1), y, a continuación, un dominio ZP (Zona Pelúcida).

Alteraciones de DMBT1

Somerville y col¹¹ encontraron deleciones homocigóticas de este gen en un 38% de los GBMs estudiados. Este grupo propone la posibilidad de que las alteraciones en el gen DMBT1 sean aún más decisivas que las de su vecino PTEN/MMAC-1 en el desarrollo tumoral. Con todo, apuntan que aún es preciso un mejor conocimiento de la secuencia genómica, y un estudio intenso de todos los posibles mecanismos de alteración.

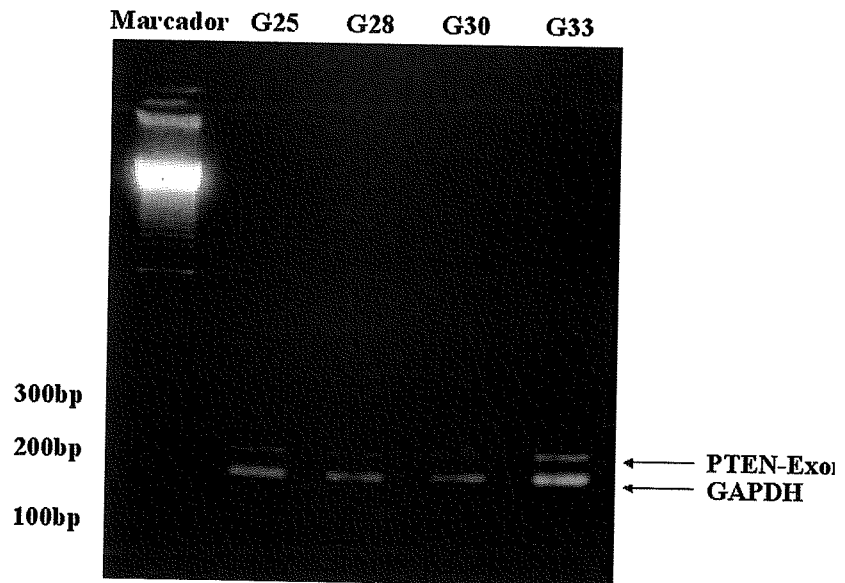


Figura 4. Delección homocigótica de PTEN demostrada en un glioblastoma (G30). Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio tras ensayo de PCR diferencial para detectar delección homocigótica de PTEN. Cada uno de los DNA extraídos de cuatro glioblastomas muestra dos bandas: la superior corresponde a un fragmento del exón 2 del gen PTEN de 202 bp, y la banda inferior corresponde a un fragmento de 160 pb del gen GAPDH. Se consideró delección homocigótica del exón 2 de PTEN cuando la banda de GAPDH que representa el DNA normal era 3 veces más intensa. Para la determinación del tamaño se incluyó en la primera calle un marcador con bandas de tamaño creciente en 100 pb (Pharmacia Biotech)

En estudios de microdissección, Fujisawa y col³⁸ proponen que las deleciones en la región terminal del cromosoma 10 (10q25-ter, donde mapean los genes DMBT1 y FGFR2, o Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos, otro posible supresor tumoral de función todavía incierta) son de principal importancia en la progresión de astrocitoma hacia glioblastoma multiforme. Este grupo encontró pérdidas de heterocigosidad en esta región en 7 de 8 focos de glioblastoma extraídos de 5 pacientes. Además, la técnica de microdissección les permitió seleccionar exclusivamente las regiones de GBM, y comparar la expresión génica con la que se daba en los astrocitomas de inferior grado próximos a los focos de glioblastoma en los mismos pacientes. Asimismo, relacionaron la adquisición del

fenotipo maligno con la pérdida de la proteína fibrilar ácida glial (GFAP).

Este grupo plantea, del mismo modo, la posibilidad de que las deleciones parciales en el cromosoma 10 sean más frecuentes en los glioblastomas secundarios, provenientes de un astrocitoma anaplásico o de un astrocitoma de bajo grado, mientras que en los glioblastomas primarios o de novo serían más comunes las deleciones grandes y las pérdidas del cromosoma entero.

CONCLUSIÓN

La investigación genética de los astrocitomas facilitará, tarde o temprano, su terapia. Mediante una nueva clasificación de los astrocitomas, no sólo basada en datos histopatológicos, sino también genéticos, se puede diagnosticar un tumor

específico con mayor certeza, o predecir si una lesión de bajo grado (astrocitoma de grado II) podría progresar hacia otra de alto grado (glioblastoma multiforme, o astrocitoma de grado IV), además de predecirse el pronóstico o la respuesta tumoral al tratamiento. Por otra parte, el conocimiento de los mecanismos moleculares que condicionan la génesis de astrocitomas, puede contribuir al desarrollo de nuevos fármacos que se dirijan específicamente a moléculas reguladoras, inhibiendo el ciclo celular o facilitando la apoptosis. En tercer lugar, el desarrollo de la terapia génica es una realidad con la que se debe contar para el tratamiento del glioblastoma en los años venideros.

Agradecimientos

Jorge Muñoz, Xing Fan y María del Mar Inda son becarios predoctorales del Gobierno de Navarra, de la Agencia Española de Cooperación Internacional, y del Ministerio de Educación y Cultura, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. KLEIHUES P, BURGER PC, SCHEITHAUER BW. Histologic typing of tumors of the central nervous system. New York, NY, Springer-Verlag 1993.
2. KLEIHUES P, OHGAKI H. Genetics of glioma progression and the definition of primary and secondary glioblastoma. *Brain Pathol* 1997; 7: 1131-1136.
3. KLEIHUES P, OHGAKI H. Primary and secondary glioblastoma: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncology* 1999; 1: 44-51.
4. SCHMITT HP. Rapid anaplastic transformation in gliomas of adulthood: selection in neuro-oncogenesis. *Pathol Res Pract* 1983; 176: 313-323.
5. KLEIHUES P, CAVANEE WK(ed). Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. IARC Press, Lyon 2000.
6. ODA T, TSUDA H, SAKAOTO M, HIROHASHI S. Different mutations of the p53 gene in nodule-in-nodule hepatocellular carcinoma as an evidence for multistage progression. *Cancer Lett* 1994; 83: 197-200.
7. VOLDORGB BR, DAMSTRUP L, SPANG-THOMSEN M, POULSEN HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997; 8: 1197-1206.
8. EKSTRAND AJ, LONGO N, HAMID ML, OLSON JJ, LIU L, COLLINS VP et al. Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene* 1994; 9: 2313-2320.
9. ELEY G, FREDERICK L, WANG XY, SMITH DI, JAMES CD. 3' end structure and rearrangements of EGFR in glioblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 23: 248-254.
10. SUGAWA N, YAMAMOTO K, UEDA S, MORITA N, KITA M, NISHINO H et al. Function of aberrant EGFR in malignant gliomas. *Brain Tumor Pathol* 1998; 15: 53-57.
11. LIU W, JAMES CD, FREDERICK L, ALDERETE BE, JENKINS RB. PTEN/MMAC1 mutations and EGFR amplification in glioblastomas. *Cancer Res* 1997; 57: 5254-5257.
12. SCHWECHHEIMER K, HUANG S, CAVANEE WK. EGFR gene amplification-rearrangement in human glioblastomas. *Int J Cancer* 1995; 62: 145-148.
13. SURE U, RUEDI D, TACHIBANA O, YONEKAWA Y, OHGAKI H, KLEIHUES P et al. Determination of p53 mutations, EGFR overexpression, and loss of p16 expression in pediatric glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 782-789.
14. GOIKE HM, ASPLUND AC, PETTERSSON EH, SANOUDOU D, COLLINS VP. Acquired rearrangement of an amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in a human glioblastoma xenograft. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 697-701.
15. HUNTER SB, ABBOTT K, VARMA VA, OLSON JJ, BARNETT DW, JAMES CD. J. Reliability of differential PCR for the detection of EGFR and MDM2 gene amplification in DNA extracted from FFPE glioma tissue. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 57-64.
16. BIERNAT W, DEBIEC-RYCHTER M, LIBERSKI PP. Mutations of TP53, amplification of EGFR, MDM2 and CDK4, and deletions of CDKN2A in malignant astrocytomas. *Pol J Pathol* 1998; 49: 267-271.
17. LEVINE JA. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-331.
18. LÓPEZ GUERRERO JA, GILBERT BOLUFER P, BARRAGÁN GONZÁLEZ E. Significado oncológico y biológico de las alteraciones moleculares de p53 en cáncer humano. *Oncología* 1997; 20: 769-782.
19. POMEROY SL. The p53 tumor suppressor gene and pediatric brain tumors. *Curr Opin Pediatr* 1994; 6: 632-635.

20. DIRKS PB, RUTKA JT. Current contents in Neuro-Oncology: the cell cycle - a review. *Neurosurgery* 1997; 40: 1000-1015.
21. WESTERMARK B, NISTER M. Molecular genetics of human glioma. *Curr Opin Oncol* 1995; 7: 220-225.
22. BURNS KL, UEKI K, JHUNG SL, KOH J, LOUIS DN. Molecular genetic correlates of p16, cdk4 and pRb immunohistochemistry in glioblastomas. *J Neuropathol Exp Oncol* 1998; 57: 122-130.
23. REIFENBERGER J, RING GU, GIES U, COBBERS L, OBERSTRAB J, AN H-X *et al*. Analysis of p53 Mutation and Epidermal Growth Factor Receptor Amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 822-831.
24. WATANABE K, SATO K, BIERNAT W, TACHIBANA O, VON-AMMON K, OGATA N *et al*. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 523-530.
25. VAN MEYEL DJ, RAMSAY DA, CASSON AG, KEENEY M, CHAMBERS AF, CAIRNCROSS JG. p53 mutation, expression, and DNA ploidy in evolving gliomas: evidence for two pathways of progression. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1011-1017.
26. NOBORI T, MIURA K, WU DJ, LOIS A, TAKABAYASHI K, CARSON DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753-756.
27. MOULTON T, SAMARA G, CHUNG WY, YUAN L, DESAI R, SISTI M *et al*. MTS1/p16/CDKN2 lesions in primary glioblastoma multiforme. *Am J Pathol* 1995; 146: 613-619.
28. WALKER DG, DUAN W, POPOVIC EA, KAYE AH, TOMLINSON FH, LAVIN M. Homozygous deletions of the multiple tumor suppressor gene 1 in the progression of human astrocytomas. *Cancer Res* 1995; 55: 20-23.
29. KARLBOM AE, JAMES CD, BOETHIUS J, CAVENEE WK, COLLINS VP, NORDENSKJÖLD M *et al*. Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum Genet* 1993; 92: 169-174.
30. LI J, YEN C, LIAW D, PODSYPANINA K, BOSE S, WANG SI *et al*. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947.
31. STECK PA, PERSHOUSE MA, JASSER SA, YUNG WK, LIN H, LIGON AH *et al*. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15: 356-362.
32. LI DM, SUN H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997; 57: 2124-2129.
33. LI DM, SUN H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15406-15411.
34. FURNARI FB, LIN H, HUANG HS, CAVENEE WK. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 12479-12484.
35. MYERS MP, PASS I, BATTY IH, VAN-DER-KAAY J, STOLAROV JP, HEMMINGS BA *et al*. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 13513-13518.
36. TOHMA Y, GRATAS C, BIERNAT W, PERAUD A, FUKUDA M, YONEKAWA Y *et al*. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 684-689.
37. RASHEED BK, STENZEL TT, MCLENDON RE, PARSONS R, FRIEDMAN AH, FRIEDMAN HS *et al*. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res* 1997; 57: 4187-4190.
38. FUJISAWA H, KURRER M, REIS RM, YONEKAWA Y, KLEIHUES P, OHGAKI H. Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol* 1999; 155: 387-394.
39. CHENEY IW, JOHNSON DE, VAILLANCOURT MT, AVANZINI J, MORIMOTO A, DEMERS GW *et al*. Suppression of tumorigenicity of glioblastoma cells by adenovirus-mediated MMAC1/PTEN gene transfer. *Cancer Res* 1998; 58: 2331-2334.
40. MOLLENHAUER J, WIEMANN S, SCHEURLEN W, KORN B, HAYASKI Y, WILGENBUS KK. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1, is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet* 1997; 17: 32-39.
41. SOMERVILLE RPT, SHOSHAN Y, ENG C, BARNETT G, MILLER D, COWELL JK. Molecular analysis of two putative tumour suppressor genes, PTEN and DMBT1, which have been implicated in glioblastoma multiforme disease progression. *Oncogene* 1998; 17: 1755-1757.