

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Lucie Štolová

Charakteristika chromozomálních změn u nefroblastomů
pomocí SNP array a MLPA

Characteristic of chromosomal changes in nephroblastomas
using SNP array and MLPA

Diplomová práce

Vedoucí práce: MUDr. Aleš Vícha, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci „Charakteristika chromozomálních změn u nefroblastomů pomocí SNP array a MLPA“ vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Aleše Víchy, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 9. 8. 2018

Lucie Štolová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli MUDr. Aleši Víchovi, Ph.D. za všechnu pomoc, trpělivost, užitečné rady a čas, který věnoval opravám této práce.

Dále Ing. Martinu Hillovi, DrSc. a Ing. Petru Gajdošovi za rady ohledně statistického zpracování a pracovníkům Laboratoře biologie solidních nádorů za spolupráci.

Můj dík patří také mé sestře Michaele Štolové za pomoc s překladem do AJ a celé rodině za podporu a ohleduplnost během celého období, kdy jsem tuto práci psala.

Abstrakt

Nefroblastom je nejrozšířenějším pediatrickým nádorem ledvin, který se vyskytuje především u mladších dětí, s průměrným věkem v době diagnózy 42,5 měsíce u dívek a 36,5 měsíce u chlapců. I přesto, že je jeho léčba v současné době velmi úspěšná a celkové přežívání dosahuje více než 90 %, je stále co nového objevovat a vylepšovat. Důležitou roli pro správný výběr léčby hraje nejenom histologie tumoru, ale také přítomné chromozomální změny. Některé z nich (např. zisk 1q, společná delece 1p a 16q, delece genu *TP53*) byly potvrzeny jako negativní prognostické markery, jelikož souvisí se zvýšeným rizikem relapsu onemocnění nebo anaplastickým typem nefroblastomu, který je řazen do skupiny vysokého rizika. Tyto změny jsou proto společně s histologií tumoru používány pro stratifikaci nefroblastomů. U některých z těchto změn bylo zjištěno, že se v nefroblastomu nachází i v heterogenním stavu (pouze v části buněk), což také komplikuje léčbu pacienta a není možné na to přijít při odběru pouze jednoho vzorku z tumoru.

V práci jsme se zaměřili na detekci chromozomálních změn přítomných v nefroblastomech 44 pacientů a jejich asociacím s klinickými daty. Některé ze známých asociací jsme prokázali (delece 22q s vyšším věkem diagnózy a anaplastickým typem nefroblastomu) a jiné se nám nepodařilo potvrdit (zisk *MYCN* a delece *TP53* s anaplastickým typem). Dále jsme se soustředili na prokázání heterogenity v přítomných chromozomálních změnách, abychom zvažili důležitost odběru většího množství vzorků z různých míst jednoho tumoru. Předpokladem bylo, že heterogenitu v tumorech potvrdíme, což se nám podařilo. K průkazu chromozomálních změn jsme použili metody MLPA a SNP array, přičemž MLPA je metodou cílenou pouze na určitá místa v genomu, zatímco SNP array umožňuje genom vyšetřit celý během jednoho vyšetření, ale s tím souvisí také jeho finanční náročnost. Proto bylo dalším cílem práce určit vhodnost použití těchto metod v klinické praxi na základě jejich shody. Hypotézu, že ve všech sledovaných znacích budou tyto metody poskytovat stejné výsledky, jsme museli zamítnout a SNP array se ukázala jako vhodnější metoda.

Klíčová slova:

Nefroblastom; Wilmsův tumor; SNP array; MLPA; heterogenita; chromozomální změna

Abstract

Nephroblastoma is the most prevalent pediatric kidney tumor, which occurs primarily in younger children with the average age at diagnosis of 42,5 months for girls and 36,5 months for boys. Even though its treatment is currently very successful and the overall survival rate reaches over 90 %, there are still more things to be discovered and improved. An important role for the right choice of treatment plays not only the histology of tumor, but also the chromosomal changes present at tumor. Some of them (for example 1q gain, simultaneous deletion of 1p and 16q, *TP53* deletion) were confirmed as negative prognostic markers because they are associated with an increased risk of relapse or with anaplastic type of nephroblastoma that is included in a high risk group. These changes are therefore used together with the tumor histology for stratification of nephroblastomas. Some of these changes were found in a heterogeneous state (only in a part of the cells) in nephroblastoma, which also complicates the treatment of the patient and which cannot be solved when only one sample is taken from the tumor.

In this work we concentrated on the detection of chromosomal changes present in nephroblastomas of 44 patients and their associations with clinical data. We have proved some of the known associations (22q deletion with a higher age at diagnosis and anaplastic type of nephroblastoma) and we could not confirm some others (*MYCN* gain and *TP53* deletion with anaplastic type of nephroblastoma). We also focused on proving heterogeneity in chromosomal changes present in nephroblastoma to consider the importance of taking more samples from different places of one tumor. The assumption was that we will confirm the heterogeneity in tumors and we succeeded. We used the MLPA and the SNP array methods to detect chromosomal changes. MLPA is a method targeting only specific locations of the genome, while SNP array allows to examine the whole genome within one examination, but there is financial difficulty related to it. Therefore the next goal of this work was to determine the suitability of using these methods in clinical practice on the basis of their concordance. We had to reject the hypothesis that these methods will provide the same results in all of the monitored changes and the SNP array has proved to be more appropriate method.

Key words:

Nephroblastoma; Wilms tumor; SNP array; MLPA; heterogeneity; chromosomal change

Obsah

1. Úvod	8
1.1. Histologické typy nefroblastomů	9
1.2. Typické chromozomální změny	12
1.2.1. Delece 1p a 16q	13
1.2.2. Zmnožení 1q	14
1.2.3. Gain genu <i>MYCN</i>	15
1.2.4. Delece 17p (genu <i>TP53</i>)	16
1.2.5. Změny na 11. chromozomu	16
1.2.6. Další změny	18
1.3. Syndromy spojené s výskytem nefroblastomu	19
1.3.1. Syndromy související s oblastí 11p13 (genem <i>WT1</i>)	20
1.3.2. Beckwith-Wiedemannův syndrom (BWS)	21
1.4. Intratumorová heterogenita nefroblastomu	21
2. Cíle práce	23
3. Materiál	23
4. Metody	24
4.1. Izolace DNA z tkáně	24
4.1.1. Použité chemikálie a zařízení	24
4.1.2. Postup	25
4.2. MLPA (multiplex ligation probe amplification)	26
4.2.1. Princip metody	26
4.2.2. Použité chemikálie a zařízení	32
4.2.3. Postup	33
4.3. SNP array	34
4.3.1. Princip metody	34
4.3.2. Použité chemikálie a zařízení	39
4.3.3. Postup	40
4.4. Statistické zpracování	44
4.5. Genomické koordináty	44
5. Výsledky	46
5.1. Analýza přítomných změn	46
5.1.1. Analýza přežití	47
5.1.2. Asociace vybraných změn s věkem pacientů v době diagnózy	50
5.1.3. Asociace vybraných změn s pohlavím pacientů	52
5.1.4. Asociace vybraných změn s histologickým typem tumoru	54

5.1.5. Asociace vybraných změn se stádiem tumoru.....	55
5.2. Srovnání metod MLPA a SNP array	56
4.3. Intratumorová heterogenita chromozomálních změn	64
4.3.1. Postup při zpracování výsledků.....	64
4.3.2. Vyhodnocení	72
6. Diskuze	77
7. Závěr.....	83
8. Seznam použitých zkratk.....	85
8. Reference	88
9. Internetové zdroje.....	103
10. Přílohy	104

1. Úvod

Ledviny, jakožto součást vylučovací soustavy, jsou důležité pro odstraňování nepotřebných látek (produktů metabolismu) ven z těla. Dochází v nich k tvorbě moči, jejímž vylučováním je v těle udržována rovnováha vody a elektrolytů.

Během embryonálního vývoje prochází ledviny třemi stádii: pronefros, mezonefros a metanefros. Vznik nového stádia je doprovázen zánikem toho předchozího, postupně vznikají nové kanálky a staré zanikají. Některé embryonální buňky však mohou přetrvat a později se stát prekurzorem nefroblastomu (Hawthorn a Cowell, 2011; Md Zin et al. 2011). Tyto prekurzorové léze jsou přítomny v ledvinách pacientů s nefroblastomem (byly nalezeny ve více než 1/3 případů a u pacientů s bilaterálním nefroblastomem v 95 %), ale objevují se i u některých zdravých jedinců (Beckwith et al. 1990; Beckwith 1993; Md Zin et al. 2011). Jejich přítomnost tedy stoprocentně nepředpovídá budoucí vznik nefroblastomu.

Pro prekurzory nefroblastomu je používán termín nefrogenní zbytky (nephrogenic rests, NR), který byl navržen v roce 1990 (Beckwith et al. 1990). Nefrogenní zbytky se dělí na dvě velké skupiny, perilobární a intralobární, podle jejich pozice vzhledem k ledvinnému laloku. Perilobární se nachází na periférii laloku a intralobární na jakémkoli jiném místě laloku. (Beckwith et al. 1990; Beckwith 1993) Nefrogenní zbytky se vyskytují unifokálně, multifokálně nebo difúzně (Beckwith et al. 1990).

Nefroblastom (jinak také Wilmsův tumor) je tedy nádor postihující ledviny, který se vyskytuje zejména u dětí, s incidencí 1 na 10000 dětí (Stiller a Parkin 1990; Scott et al. 2006). U nich tvoří nefroblastomy přibližně 90 % ze všech nádorů ledvin, zatímco u dospělých se objevují spíše vzácněji (Mitry et al. 2006; Umbrella Protocol SIOP-RTSG 2016). Průměrný věk nástupu je u dívek 42,5 měsíce a u chlapců 36,5 měsíce (Vujančić 2009). U 5 - 10 % pacientů se Wilmsův tumor vyskytuje bilaterálně nebo multicentricky (Coppes et al. 1989; Ritchey et al. 2005). Většinou je sporadický, ale v přibližně 10 % je spojen se syndromy nebo vrozenými vadami (Narod et al. 1997; Merks et al. 2005).

V současné době se výzkumu a klinickým studiím zabývajícím se Wilmsovým tumorem věnují dvě hlavní organizace, Children's Oncology Group (COG) a International Society of Paediatric Oncology (SIOP). COG sídlí v Severní Americe a v rámci ní se na nefroblastom zaměřuje National Wilms Tumor Study Group (NWTSG), založená v roce

1969. SIOP působí v Evropě, kde vznikla v roce 1969, a v ní se nefroblastomem zabývá Renal Tumour Study Group (RTSG) od roku 1970. Tyto skupiny mají odlišný přístup v léčbě nefroblastomu, ale podobné výsledky, co se týče dlouhodobého přežívání pacientů. (Al-hussain et al. 2014; Pritchard-Jones a Pritchard 2004)

Celkové přežití pacientů s nefroblastomem je přes 90 % (Pritchard-Jones a Pritchard 2004; Green et al. 2014). Zbylou část tvoří pacienti s nefroblastomy vysokého rizika, mezi něž se řadí difúzně anaplastický a blastémový typ nefroblastomu.

S histologickým typem jsou spojeny i chromozomální změny, kterým je především věnována tato práce.

1.1. Histologické typy nefroblastomů

Z histologického hlediska existuje několik typů nefroblastomů, které se navzájem liší stavbou (např. velikostí a diferenciací buněk), ale i rizikovostí a některými chromozomálními změnami.

V nefroblastomech se vyskytují tři základní typy buněčné tkáně (komponenty): blastémová, epiteliální a stromální. Tyto tkáně se liší diferenciací buněk, které se v nich nalézají. (Beckwith a Palmer 1978)

Nejjednodušším typem je blastémový. Je tvořen malými až středními buňkami s kulatými jádry. Ze všech typů jsou tu buňky nejméně diferencované. Jsou uspořádané difúzně nebo mohou vytvářet některé vzory (např. nodulární, bazaloidní nebo serpentine).

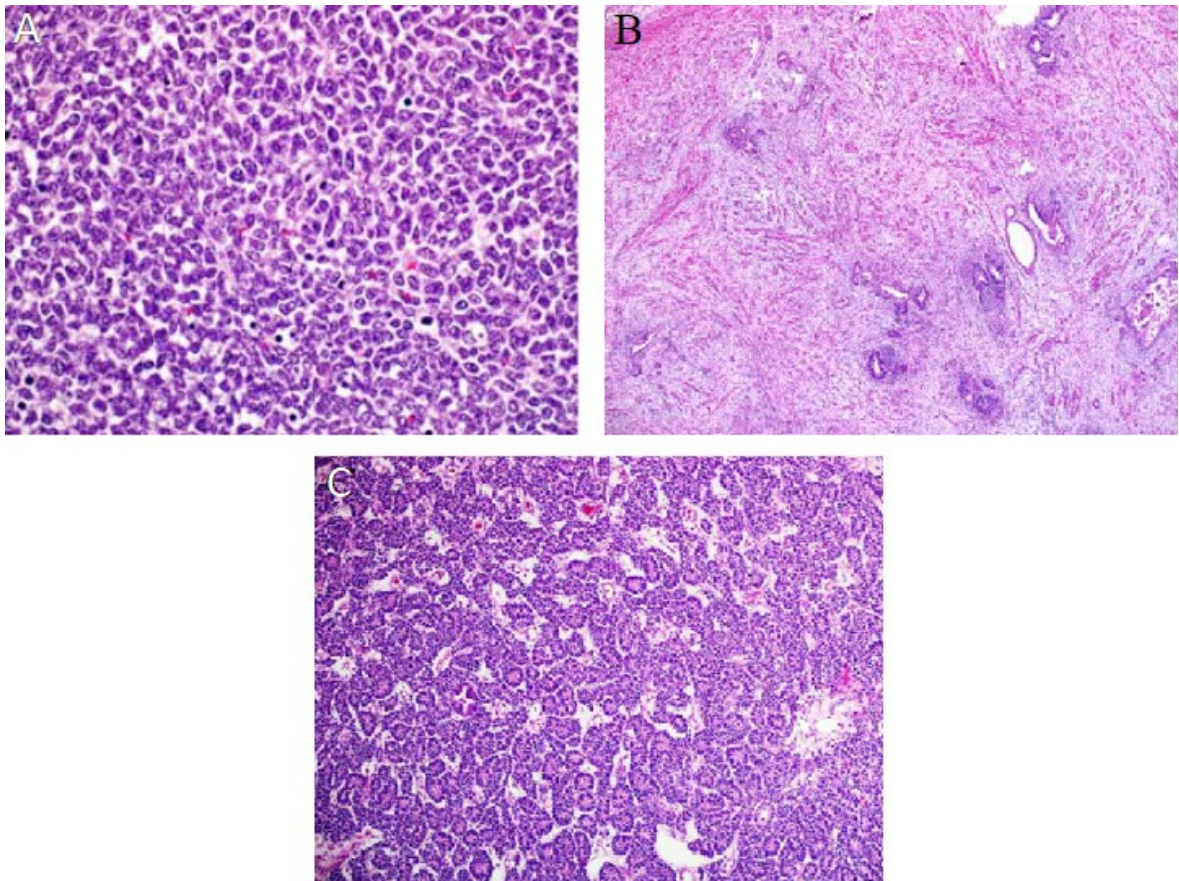
Epiteliální komponenta sestává z více diferencovaných buněk. Ty mohou tvořit rozety nebo různě diferencované tubuly a glomerulární struktury.

Stromální komponenta je nejvíce diferencovaná. Nachází se v ní buňky hladké a příčně pruhované (kosterní) svaloviny, dále buňky chrupavek a kostí a tuková tkáň. Nachází se tu však i nediferencované mezenchymální buňky. (Al-hussain et al. 2014)

Tyto komponenty jsou v nefroblastomu obsaženy různou měrou. Některé nefroblastomy jsou složeny ze všech tří typů, jiné pouze ze dvou. Podle zastoupení jednotlivých komponent se nefroblastomy rozdělují do tří subtypů – blastémový, epiteliální a stromální. (Weirich et al. 2001; Vujanic et al. 2002; Beckwith a Palmer 1978) Je-li v nefroblastomu obsaženo více než 65 % stromální komponenty, jedná se o stromální

subtyp. Pokud převládá epiteliální složka (nad 65 %), lze nefroblastom nazvat epiteliální. Obdobně je to u blastémového typu. Nepřevažuje-li takto žádná složka, jedná se o smíšený (trifázický) nefroblastom. (Beckwith a Palmer 1978; Vujanic et al. 2002) Podle SIOP (International Society of Paediatric Oncology) je však jako smíšený nazván i nefroblastom, který obsahuje více než 10 % blastémové komponenty, přičemž nezáleží na zastoupení epiteliální a stromální složky. (Vujanic et al. 2002)

Typ nefroblastomu se takto určuje pouze z vitálních buněk, kterých musí tumor obsahovat více než 1/3. Jinak je označován jako regresivní nebo kompletně nekrotický (pokud nezbyvá žádná vitální tkáň). (Vujanic et al. 2002)

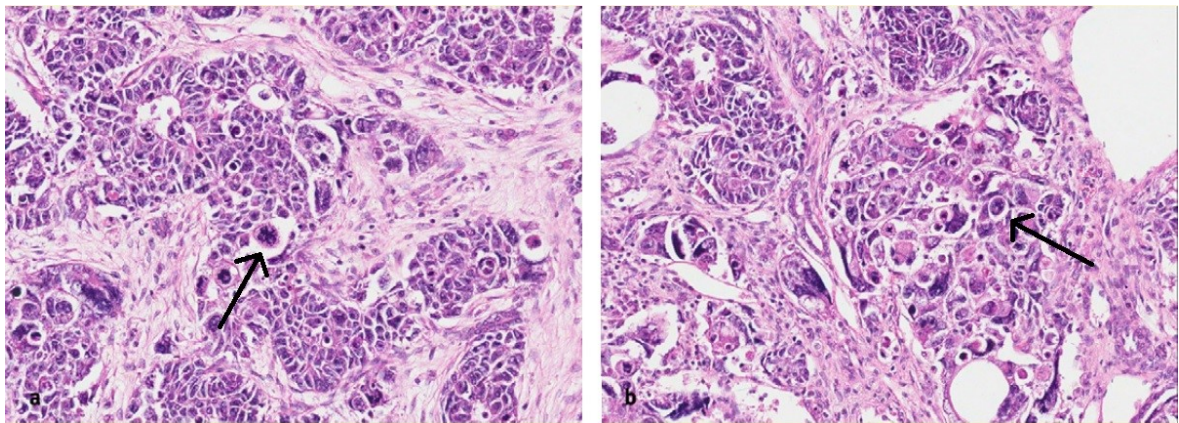


Obr. 1: Základní histologické typy

A, Blastémový typ. B, Stromální typ. C, Epiteliální typ s převažující tubulární diferenciací.
(Al-hussain et al. 2014; upraveno; zvětšení není uvedeno)

Přibližně v 5 % nefroblastomů je přítomna anaplázie (Faria et al. 1996). Ta je definována jadernými změnami buněk. Podle Beckwith a Palmer (1978) musí splňovat

následující podmínky. Průměr jader atypických buněk je třikrát vyšší než jader sousedních buněk stejného typu, dále mají zvýšený počet chromozomů (spojený s hyperchromazií) a mitóza u nich probíhá atypicky. Dochází například k multipolární mitóze (Faria et al. 1996). Anaplázie se dělí podle uspořádání atypických buněk na fokální a difúzní. Fokální se vyznačuje atypickými buňkami na jednom nebo několika místech tumoru, která jsou ostře ohraničena od ostatních buněk. Naopak při difúzní anaplázii jsou atypické buňky v rámci tumoru roztroušeny a nejsou tak zřetelně odděleny od zbytku tumoru. (Faria et al. 1996; Zuppan et al. 1988) Anaplázie se objevuje především v blastémové nebo epiteliální komponentě. Nachází se i ve stromální, ovšem jen vzácně je limitována pouze na ni. (Al-hussain et al. 2014)



Obr. 2: Anaplastický nefroblastom

Na levém obrázku je vidět atypická multipolární mitóza, na pravém zvětšená jádra a hyperchromazie. (Vujanić 2009; upraveno; zvětšení není uvedeno)

Každý typ nefroblastomu je jinak rizikový a na základě toho byly různé typy rozděleny do tří skupin – nízkého, středního a vysokého rizika. K nádorům nízkého rizika se řadí kompletně nekrotický nefroblastom. Skupinu se středním rizikem zastupují nefroblastomy epiteliálního nebo stromálního typu, dále pak smíšené, regresivní a nefroblastomy s fokální anaplázií. Nejvyšší riziko představují blastémové a difúzně anaplastické. (Delemarre et al. 1996; Vujanic et al. 2002)

1.2. Typické chromozomální změny

Nádorové buňky mají na rozdíl od zdravých odlišný metabolismus a schopnost nekonečně se replikovat a vyhýbat se apoptóze. Mnoho těchto změn je způsobeno mutacemi v protoonkogenech a tumor-supresorových genech. Těmito mutacemi jsou i chromozomové aberace, mezi které se řadí různě dlouhé amplifikace (zmnožení úseku chromozomu) nebo delece (ztráta části chromozomu), při kterých dochází ke změně množství genetického materiálu, a dále například translokace (výměna dvou částí mezi dvěma nehomologními chromozomy). U různých typů nádorů najdeme různé chromozomální změny, z nichž některé se vyskytují s vyšší frekvencí a jsou pro daný typ nádoru typické. Některé z těchto změn hrají klíčovou roli v určení prognózy a ve výběru léčby pacienta.

Stejně je tomu tak i u nefroblastomu. Mezi nejfrekventovanější změny na chromozomech se řadí delece 1p, zmnožení 1q, delece 16q, amplifikace 17p, dále delece 11p, delece *WTX*, zisk *MYCN* a např. zmnožení (trizomie) 8. nebo 12. chromozomu *spreadico* (Spreadico et al. 2013; Grundy et al. 2005; Rivera et al. 2007; Hawthorn a Cowell 2011; Md Zin et al. 2011). Některé změny jsou častěji nacházeny při relapsu onemocnění (např. zisk 1q, společná změna delece 1p a 16q), jiné zase u anaplastického typu nefroblastomu (např. delece 17p, zisk *MYCN*) (Natrajan et al. 2007; Gratias et al. 2013; Bardeesy et al. 1994; Hing et al. 2001).

Tab. 1: Souhrn některých chromozomálních změn typických pro nefroblastom (Md Zin et al. 2011; upraveno)

Cytogenetické abnormality	
Částečný zisk	1q
Částečná ztráta	1p
	11q
	16q
	1q
	22q
Kompletní ztráta	22
	16
	11
Trizomie	12
	18
	13
	8

1.2.1. Delece 1p a 16q

Tyto změny jsou u nefroblastomů poměrně časté a byly popsány v několika různých studiích. Delece krátkého raménka chromosomu 1 (1p) se vyskytuje přibližně u 11 % a delece dlouhého raménka 16. chromosomu v 17 % nefroblastomů s příznivou histologií. (Grundy et al. 2005, 1994)

Oběma delecemi, 1p i 16q, se zabýval Grundy et al. (2005). Do studie byly zahrnuti pacienti s nefroblastomy s příznivou histologií i anaplastického typu. Změny se s vyšší frekvencí vyskytovaly u anaplastických nefroblastomů, ale pouze u delece 16q byl rozdíl signifikantní. Není tedy jisté, zda delece 1p také souvisí s anaplastickým typem. Asociace delece 16q s anaplastickými nefroblastomy byla později potvrzena v dalších studiích (Wittmann et al. 2007; Messahel et al. 2009). Zároveň bylo zjištěno, že delece 1p a 16q v nefroblastomech s příznivou histologií souvisí se zvýšeným rizikem relapsu (je vyšší, pokud jsou přítomny obě změny zároveň), ale není jednoznačně prokázáno, že souvisí se zhoršeným celkovým přežíváním. Změny jsou využívány ve stratifikaci nefroblastomů jako prognostické faktory, protože souvisí s horší prognózou. (Spreafico et al. 2013; Grundy et al. 2005; Vujanić 2009; Davidoff 2010)

K delecí 1p mohou vést různé mechanismy, vzniká např. pomocí izochromozomu 1q, kruhového (ring) chromozomu 1 nebo nebalancovanou translokací (Bown et al. 2002). U mnoha nefroblastomů dochází k delecí zahrnující oblast 1p35-p36, která je spojena i s dalšími typy nádorů (např. neuroblastom, oligodendrogliom, hepatoblastom). (Steinberg et al. 2000; Steenman et al. 1997; Tamimi et al. 2007; Kraus et al. 1996)

Delece 16q může vzniknout jako důsledek nebalancované translokace mezi 16q a 1q, která je následována duplikací normálního chromozomu 1. Dochází tak zároveň k delecí 16q a trizomii (amplifikaci) 1q. (Kaneko et al. 1983; Grundy et al. 2005)

1.2.2. Zmnožení 1q

Tato změna se vyskytuje přibližně v 28 % nefroblastomů a je tak jednou z nejčastějších změn. Ve většině případů postihuje celé dlouhé raménko chromozomu, ale pomocí změn, které byly kratší, byl nalezen nejmenší překryvný region v oblasti 1q22-23. (Bown et al. 2002; Chagtai et al. 2016; Gratias et al. 2016; Natrajan et al. 2006; Gratias et al. 2013)

Bylo zjištěno, že zmnožení 1q u nefroblastomů s příznivou histologií souvisí s horším celkovým přežíváním pacientů. Celkové přežití u pacientů se ziskem 1q je nižší (cca 88 %) než u pacientů bez této změny (cca 96 %). Dále je tato změna spojena se zvýšeným rizikem relapsu. Mohl by to tedy být důležitý nepříznivý prognostický marker u nefroblastomů s příznivou histologií, a proto byl navržen, aby byl používán pro stratifikaci Wilmsova tumoru. (Gratias et al. 2016, 2013; Chagtai et al. 2016; Hing et al. 2001)

Zmnožení 1q je velmi často doprovázeno také delecí 1p nebo 16q, což poukazuje na některé ze způsobů jejího vzniku. Nejčastějším je nebalancovaná translokace, při které dochází k výměně mezi 1q a 16q, a dalším izochromozom 1q. Amplifikace 1q však není vždy asociována s některou z těchto změn, proto musí vznikat i jinou cestou, např. translokací 1q s jinými chromozomy. (Hing et al. 2001; Segers et al. 2013; Gratias et al. 2013)

1.2.3. Gain genu *MYCN*

Gen *MYCN* se nachází v oblasti 2p24.3, tedy na krátkém raménku druhého chromozomu (Schwab et al. 1984; Garson et al. 1987). Patří do genové rodiny MYC protoonkogenů. Její členové leží na různých chromozomech, ale produkují proteiny (transkripční faktory) s podobnou strukturou (podobnými doménami; všechny obsahují trans-aktivační a DNA vázající doménu) a funkcí (Mathsyaraja a Eisenman 2016; Ruiz-Pérez et al. 2017). Produktem *MYCN* genu je protein MYCN o velikosti 60–63 kDa, který se podílí na buněčném růstu, proliferaci, diferenciaci a apoptóze buněk. (Okubo et al. 2005; Ruiz-Pérez et al. 2017)

Gen *MYCN* je zmnožen (do 10 kopií genu) nebo amplifikován (více jak 10 kopií genu) u mnoha typů nádorů (např. neuroblastom, meduloblastom, rabdomyosarkom), zvýšená exprese nebo dysregulace byla zaznamenána ve více než 70 % typů lidských nádorů (Ruiz-Pérez et al. 2017; Micale et al. 2016). Při narušení regulace *MYCN* a zvýšení jeho exprese dochází ke zvýšení proliferace a růstu buněk a může to vést ke vzniku nádoru. (Wilde a Ayer 2015)

Zmnožení genu *MYCN* se vyskytuje i u nefroblastomů a je asociováno s difúzně anaplastickým typem. Tato asociace byla zjištěna nejprve ve studii z roku 2010 (Williams et al. 2010), ve které bylo zkoumáno 104 vzorků nefroblastomu. Zisk genu *MYCN* byl přítomen v 8,7 % všech vzorků, ale u difúzně anaplastických nefroblastomů byl nalezen v 32 %. Předpokládalo se tedy, že je spojen především s difúzně anaplastickým typem, avšak v příštím roce byla tato domněnka vyvrácena. Ve studii (Williams et al. 2011) zahrnující přes 300 vzorků, ve které byly porovnávány anaplastické nefroblastomy a nefroblastomy příznivé histologie, nebyl, co se týče frekvence zisku *MYCN*, zaznamenán signifikantní rozdíl. I přesto byla nakonec asociace s difúzně anaplastickým typem nefroblastomu signifikantně potvrzena ve studii s 293 vzorky nefroblastomu. (Williams et al. 2015).

Nadměrná exprese *MYCN* se u Wilmsova tumoru objevuje i bez toho, aby byl gen zmnožen. Musí tam tedy působit i jiné mechanismy, aby byla exprese zvýšena. (Nisen et al. 1986; Williams et al. 2004, 2011)

1.2.4. Delece 17p (genu *TP53*)

Gen *TP53* (tumor protein 53) leží na krátkém raménku 17. chromozomu v oblasti 17p13.1. Je to tumor-supresorový gen, jehož produktem je protein p53 (Freed-pastor a Prives 2012; Vogelstein et al. 2000; OMIM: 191170). p53 je transkripční faktor, skládá se z pěti domén (N-terminální transkripci aktivující, na prolin bohatá, DNA vázající, oligomerizační a C-terminální doména) a vyskytuje se ve formě tetrameru (Laptenko a Prives 2006; Jeffrey et al. 1995).

Ve zdravých buňkách je exprimován v nízkých hladinách, ale účastní se mnoha důležitých procesů, a to například regulace exprese některých genů, buněčné proliferace (zástava buněčného cyklu), apoptózy, oprav DNA nebo změn v metabolismu. Mutace v genu *TP53* má tedy pro buňku závažné důsledky. Ztráta jeho funkce zapříčiní, že nemůže být správně regulován buněčný cyklus. Dochází tak k předčasnému dělení buňky a nekonečné proliferaci a tím ke vzniku nádoru a hromadění chyb v DNA.

Mutace v genu *TP53* je nejčastější příčinou vzniku nádoru a je asociována s mnoha typy rakoviny (Vogelstein et al. 2000; Petitjean et al. 2007; Hainaut a Hollstein 2000). Je také příčinou Li-Fraumeni syndromu (autozomálně dominantní dědičné onemocnění, které se projevuje různými nádory v rámci jedné rodiny). (Malkin et al. 1990; Srivastava et al. 1990)

U nefroblastomů může mutace v genu *TP53* sloužit jako prognostický marker pro nefroblastomy s nepříznivou histologií. Je spojena s anaplastickým typem, který patří do skupiny vysokého rizika. Je přítomna přibližně u 50 - 75 % anaplastických nefroblastomů a předpokládá se, že získáním mutace v genu *TP53* se může nefroblastom s příznivou histologií vyvinout v anaplastický nefroblastom (Al-hussain et al. 2014; Jadali et al. 2011; Williams et al. 2011; Natrajan et al. 2007; Md Zin et al. 2011; Bardeesy et al. 1994). Dále může být asociována s relapsem Wilmsova tumoru a metastazováním (Sredni et al. 2001; Lahoti et al. 1996; Md Zin et al. 2011).

1.2.5. Změny na 11. chromozomu

Na 11. chromozomu se nachází dva lokusy spojované s nefroblastomem, *WT1* a *WT2* (wilms tumor 1 a 2), oba na krátkém raménku. *WT1* lokus je v regionu 11p13

a zahrnuje stejnojmenný gen *WT1*. Jako lokus *WT2* je známa oblast 11p15.5. (Rose et al. 1990; OMIM: 194071)

Tumor-supresorový gen *WT1* kóduje 55kDa produkt, který působí jako transkripční faktor. Součástí DNA-vázací domény jsou 4 motivy zinkových prstů, kterými se váže na promotor cílového genu. (Haber et al. 1991; Buckler et al. 1991; Menke et al. 1998; Mrowka a Schedl 2000; Md Zin et al. 2011)

Je jedním z genů, které hrají zásadní roli při vývoji urogenitálního systému a je během fetálního vývoje ve vysokých hladinách exprimován nejprve v mezenchymálních buňkách a později (po jejich diferenciaci) v epitelálních buňkách ledvin (Haber et al. 1990; Pritchard-Jones et al. 1990). Účastní se vývoje ureterového pupenu, který vyrůstá z Wolfova vývodu, změny mezenchymálních buněk v metanefros na epitelální a diferenciaci metanefrogenního blastému v nefrony. (Al-hussain et al. 2014; Kreidberg et al. 1993)

Je to první gen, který byl v souvislosti s nefroblastomem charakterizován a byl potvrzen jako gen podílející se na tumorigenezi Wilmsova tumoru na základě překrývajících se delecí v 11p13 oblasti (Md Zin et al. 2011; Gessler et al. 1990; Call et al. 1990). Somatické změny zahrnující *WT1* se nachází přibližně v 10-15 % sporadických nefroblastomech a zahrnují velké delecce nebo intragenové mutace (Little a Wells 1997; Varanasi et al. 1994; Reddy a Licht 1996). Pokud jsou mutace germinální, mohou být asociovány s některými syndromy, nejčastěji s WAGR (WT-aniridie-genitální anomálie-retardace), kde je *WT1* obvykle deletován, DDS (Denys-Drashův syndrom) nebo Frasierovým syndromem (Pelletier et al. 1991; Huff 1998; Barbaux et al. 1997). Zároveň jsou nefroblastomy s germinální mutací *WT1* častěji bilaterální nebo multicentrické a objevují se v nižším věku pacienta. (Al-hussain et al. 2014)

Mutace nebo delecce genu *WT1* se nachází i v nefrogenních zbytcích, konkrétně jsou spojeny spíše s intralobárními nefrogenními zbytky. Je to tedy časná změna, která se podílí na zahájení vzniku nefroblastomu. (Park et al. 1993; Charles et al. 1998)

Lokus *WT2* se vyznačuje spíše epigenetickými změnami, jelikož obsahuje dvě imprintované domény, *IGF2/H19* a *KIP2/LIT1* (Feinberg 2000). V souvislosti

s nefroblastomem jsou studovány především geny *IGF2* a *H19*, u kterých bylo prokázáno, že jsou v nefroblastomu abnormálně exprimovány. Za normálních okolností je *IGF2* exprimován pouze z paternální alely a *H19* z maternální. V nefroblastomu často dochází ke ztrátě imprintingu (LOI – loss of imprinting) genu *IGF2*, doprovázeného hypermetylací *H19*. V některých případech k LOI dojde ztrátou maternální alely a duplikací paternální, tedy uniparentální dizomií. Změny ve WT2 se vyskytují u 50-75 % nefroblastomů. Zatímco mutace WT1 jsou spojeny s intralobárními nefrogenními zbytky, abnormality ve WT2 lokusu jsou asociovány spíše s perilobárními. (Steenman et al. 1994; Moulton et al. 1994; Rainier et al. 1993; Segers et al. 2012; Al-hussain et al. 2014; Scott et al. 2012)

1.2.6. Další změny

Kromě výše zmíněných změn bylo popsáno mnoho dalších, které jsou nebo by mohly být spojovány s nefroblastomem.

Jednou z nich je delece zahrnující gen *WTX*. Rivera et al. (2007) hledali genetické abnormality ve vzorcích 51 nefroblastomů a u 5 mužských pacientů našli delece v oblasti Xq11.1. Tyto delece se překrývaly a zahrnovaly jediný gen, který Rivera et al. (2007) pojmenovali *WTX* (Wilms tumor gen na X chromozomu). *WTX* se tedy nachází na dlouhém raménku chromozomu X blízko k centroměře. Kóduje protein dlouhý 1135 aminokyselin, který se účastní degradace beta-*kateninu* a tím regulace Wnt signální kaskády (Major et al. 2007). Pro tento gen je používán ještě jiný název, *AMER1* (APC membrane recruitment protein 1), protože se podílí na intracelulární distribuci proteinu APC (adenomatous polyposis coli). (Grohmann et al. 2007; Wegert et al. 2009) *WTX* byl navržen jako tumor-supresorový gen, kterému stačí jeden zásah (zásah na jedné alele), aby byl kompletně inaktivován, jelikož u mužů dochází k mutaci na jediném chromozomu X a u žen většinou k mutaci na chromozomu, který je aktivní (Rivera et al. 2007). *WTX* bývá inaktivován v 6-30 % sporadických nefroblastomů (Al-hussain et al. 2014). Ve studii Rivera et al. (2007) to bylo u 30 % pacientů, z nichž se přibližně ve dvou třetinách jednalo o delecii a u ostatních o bodové mutace. V některých pozdějších studiích prováděných na větším množství vzorků však frekvence výskytu byly nižší (Perotti et al. 2008; Wegert et al. 2009). Mutace postihující gen *WTX* nejspíše nejsou důležité pro zahájení tumorigeneze

nefroblastomu a objevují se spíše až v pozdější fázi jeho vývoje, kdy zasahují pouze část buněk (Wegert et al. 2009; Fukuzawa et al. 2010).

S anaplastickými nefroblastomy může být spojena také delece dlouhých ramének 4. a 14. chromozomu, jak zjistili Williams et al. (2011). Ti porovnávali rozdíly ve frekvencích změn mezi anaplastickými nefroblastomy a nefroblastomy s příznivou histologií. Měli k dispozici vzorky z 55 nefroblastomů s příznivou histologií a 23 anaplastických a našli mezi nimi signifikantní rozdíly ve frekvencích výskytu delece 4q a 14q, které se častěji vyskytovaly u anaplastických.

Dalšími změnami, které se ve vyšší míře vyskytují u Wilmsova tumoru jsou různé trizomie, nejčastěji 6., 8. nebo 12. chromozomu. Jejich frekvence se pohybují kolem 20 %. Zatím není znám jejich význam, nebyla zjištěna žádná asociace s histologickým typem nebo stádiem tumoru. Mohly by se však podílet na patogenezi nefroblastomu zvýšením exprese některých genů, které se na nich nachází. (Gow a Murphy 2002; Kullendorff et al. 2003; Md Zin et al. 2011)

1.3. Syndromy spojené s výskytem nefroblastomu

Nefroblastom se nevyskytuje pouze sporadicky, ale přibližně v 10 % je spojen se syndromy nebo vrozenými vadami. Syndromů, které jsou spojovány s výskytem nefroblastomu je velké množství, ale jen u některých bylo zvýšené riziko vzniku nefroblastomu potvrzeno. Příčinou vzniku těchto syndromů je často germinální mutace v genech (oblastech) spojených s nefroblastomy. Mezi tyto syndromy patří například Beckwith-Wiedemannův, WAGR nebo Denys-Drashův syndrom. (Scott et al. 2006; Md Zin et al. 2011; Merks et al. 2005; Narod et al. 1997)

Tab. 2: V tabulce jsou zobrazeny různé syndromy predisponující k nefroblastomu a geny a mutace zapojené do jejich vzniku (Md Zin et al., 2011; upraveno)

Syndromy predisponující k Wilmsovu tumoru	Zapojené geny a/nebo mutace
Spojené s 11p13	
Denys-Drashův	Bodové mutace v 11p13/WT1 (doména zinkových prstů)
WAGR	Velké delece 11p13/WT1
Frasierův	Bodové mutace (KTS donorové sestřihové místo)
Spojené s 11p15	
Beckwith-Wiedemannův	IGF2 metylační změny s mnoha dalšími zahrnutými geny (<i>H19</i> , <i>p57</i> a <i>LIT1</i>)
Hemihypertrofie	IGF2 metylační změny s mnoha dalšími zahrnutými geny (<i>H19</i> , <i>p57</i> a <i>LIT1</i>)
Spojené s chromozomální změnou	
Trizomie 18	Neznámé
Trizomie 13	Neznámé
2q37 delece	Mutace miR-562, zvýšená exprese <i>EYA1</i>
Ostatní	
Perlmanův	Neznámé
Simpson-Golabi-Behmelův	Bodové mutace, mikrolece <i>Glypican (GPC3)</i>
Sotosův	Bodové mutace, mikrolece <i>NSD1</i>
Familiální Wilmsův tumor (FWT)	<i>FWT1</i> (17q12-21) a <i>FWT2</i> (19q13.4)
Li-Fraumeni	<i>TP53</i> mutace
Fanconioho anémie podskupina D1	Bialelická <i>BRCA2</i> mutace (heterozygotní <i>BRCA2</i> mutace predisponuje k rakovině vaječníků a prsu, ne k Wilmsově tumoru)
Bloomův	Neznámé

1.3.1. Syndromy související s oblastí 11p13 (genem *WT1*)

1.3.1.1. Wilmsův tumor-aniridie-genitální anomálie-retardace (WAGR) syndrom

WAGR syndrom byl v souvislosti s genem *WT1* charakterizován jako první. Vyskytuje se s prevalencí 1/1000000 lidí a je diagnostikován přibližně u 0,75 % pacientů s nefroblastomem. Je způsobený velkými delecemi v oblasti 11p13 zahrnujícími geny *WT1* a *PAX6*, které se podílí na vývoji urogenitálního systému. Jak už název syndromu napovídá, mezi nejdůležitější klinické příznaky patří nefroblastom, celková nebo částečná aniridie (chybění duhovky), abnormality urogenitálního systému a mentální retardace. Delece genu *WT1* je zodpovědná za nefroblastom a genitální anomálie a delece *PAX6* za aniridii. (Breslow et al. 2003; Francke et al. 1979; Han 2016; Riccardi et al. 1978; Scott et al. 2006; Ton et al. 1991; OMIM: 194072)

Nefroblastomy pacientů s WAGR mají častěji původ v intralobárních nefrogenních zbytcích a jsou příznivé histologie. (Breslow et al. 2003)

1.3.1.2. Denys-Drashův syndrom

Denys-Drashův syndrom je u většiny pacientů způsoben missense mutacemi v genu *WT1* (často v exonu 8 nebo 9). Následkem těchto mutací je ve vznikajícím proteinu postižena doména se zinkovými prsty, kterými se za normálních okolností váže na DNA, aby mohl fungovat jako transkripční faktor. Typickými klinickými příznaky DDS jsou genitální abnormality u chlapců (např. pseudohermafroditismus), nefroblastom (přibližně u 74 % pacientů; asociace s intralobárními nefrogenními zbytky) a nefropatie. První příznaky se objevují brzy, přibližně do 3 let věku. (Baird et al. 1992; Pelletier et al. 1991; Drash et al. 1970; Koziell et al. 2000)

1.3.2. Beckwith-Wiedemannův syndrom (BWS)

Tento syndrom se vyskytuje s prevalencí okolo 1 na 13700 dětí. Jedná se o syndrom spojený s vyšším růstem během prenatálního vývoje a v prvních letech života. S tím souvisí mnoho různých klinických příznaků, např. makroglosie (zvětšený jazyk), gigantismus, defekty břišní stěny, hemihypertrofie, hypoglykémie nebo visceromegalie. Také je zvýšené riziko vzniku embryonálních malignit, nejčastěji nefroblastomu nebo hepatoblastomu. Nefroblastom je přítomen přibližně u 3 % pacientů. (Elliott et al. 1994; Pettenati et al. 1986; Weksberg et al. 2010; Wiedemann 1983; OMIM: 130650)

Příčinou vzniku Beckwith-Wiedemannova syndromu jsou genetické a epigenetické abnormality v oblasti 11p15. Přibližně v 50 % případů dochází ke ztrátě metylace v IC2 (imprintované centrum 2, obsahuje velké množství imprintovaných genů) a v 5 % k zisku metylace *H19* v IC1 (imprintované centrum 1, zahrnuje geny *IGF2* a *H19*). U 20 % pacientů je BWS způsoben paternální uniparentální dizomií. (Weksberg et al. 2005; Scott et al. 2006; Henry et al. 1991; Bliiek et al. 2001; Weksberg et al. 2010)

1.4. Intratumorová heterogenita nefroblastomu

Intratumorovou heterogenitou na úrovni chromozomálních změn u nefroblastomů se do současné doby zabývalo pouze několik studií a není tak stanoven jejich klinický ani biologický význam (Cresswell et al. 2016; Wegert et al. 2009, 2017). Jak uvádí Cresswell,

et al. (2016), byla heterogenita studována především na dospělých nádorech, např. renální karcinom (Gerlinger et al. 2012), což je dáno tím, že dospělé nádory se před diagnózou rozvíjí delší dobu a lze tak vysledovat některé evoluční dráhy. To není v takové míře možné u dětských pacientů.

Některé chromozomální změny vyskytující se v nádoru jsou příčinou jeho vzniku a vedou k počátku tumorigeneze. Takové změny jsou přítomny ve všech buňkách nádoru, zatímco jiné, které vznikají v průběhu vývoje tumoru se pak vyskytují pouze v části buněk. To má za následek, že v různých oblastech nádoru můžeme nalézt odlišné změny. (Shlush a Hershkovitz 2015)

Intratumorové heterogenitě dětských nefroblastomů se věnovali Cresswell et al. (2016) ve studii zahrnující 20 pacientů, kteří předpokládají, že je potřeba odebrat alespoň 3 vzorky z různých míst jednoho nádoru, aby bylo detekováno více než 95 % případů se ziskem 1q. Tuto změnu našli u 9 pacientů a většinou (v 7 případech) byla heterogenní, což značí, že vzniká až v pozdější fázi vývoje tumoru. Opačným případem je LOH 11p15, která se ukázala jako časná změna, jelikož byla u všech pacientů, kde byla detekována, přítomna shodně ve všech vzorcích.

Další změnou, která vzniká později a vyskytuje se pouze v částech tumoru, je delece genu *TP53*, které se věnovali Wegert, et al. (2017). Ti se zaměřili na anaplastické nefroblastomy od 23 pacientů a v 18 případech byla tato delece přítomna pouze ve vzorcích, které byly odebrány z regionu s anaplastickými buňkami. U zbylých 5 pacientů buď tato změna byla přítomna i v ne-anaplastickém regionu nebo naopak v anaplastickém chyběla.

Delece genu *WTX* je další heterogenní změnou, která vzniká jako událost v pozdější fázi a je tak přítomna pouze v části buněk nefroblastomu. (Wegert et al. 2009)

2. Cíle práce

Tato práce je postavena na třech cílech, které jsme si stanovili. Těmi jsou:

- Analyzovat změny (zisky a delece) přítomné u pacientů a otestovat jejich závislost s pohlavím, věkem diagnózy pacienta, stádiem onemocnění a histologickým typem nefroblastomu
- Stanovit vhodnost a shodu výsledků použitých metod, MLPA a SNP array
- Vyhodnotit četnost a typy chromozomálních změn při intratumorové heterogenitě.

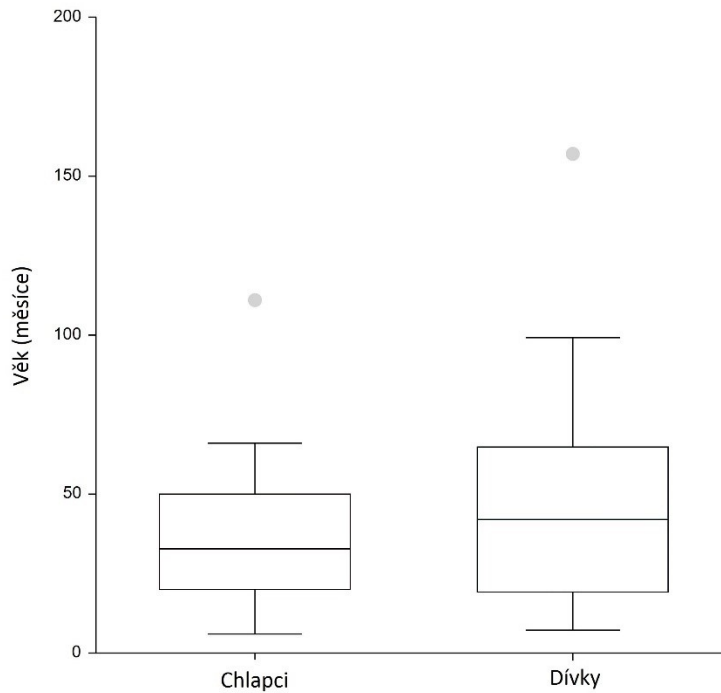
V souvislosti s těmito cíly jsme definovali dvě hypotézy, které bychom chtěli v práci ověřit:

- Výsledky vyšetření MLPA a SNP array budou ve sledovaných znacích stejné
- Při přítomnosti chromozomálních změn prokážeme jejich heterogenitu tam, kde vyšetříme 2, a nebo více vzorků tkáně z jednoho nádoru

3. Materiál

Materiálem pro tuto práci byla histologicky ověřená nádorová tkáň nefroblastomu. Jednalo se o tkáň pacientů, kteří byli přijati na Klinice dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a Fakultní nemocnice v Motole v letech 2009-2018. Z nádorové tkáně byla izolována DNA, která byla dále analyzována metodami MLPA a SNP array.

K dispozici jsme měli celkem 78 vzorků nádorové tkáně odebraných od 44 pacientů (od některých pacientů bylo odebráno více vzorků z různých částí nádoru). Z těchto vzorků 4 pocházely z relapsů, ostatní z primárních nádorů. V kohortě pacientů bylo 24 dívek a 20 chlapců. Nejmladšímu pacientovi bylo 6 měsíců a nejstaršímu 13 let. Průměrný věk v době diagnózy byl u dívek 47,5 měsíce a u chlapců 36,5 měsíce. Přestože je věk v době diagnózy u chlapců nižší, není to statisticky signifikantní rozdíl ($p = 0,34$).



Graf 1: Věk pacientů v době diagnózy v závislosti na pohlaví

Na svislé ose je znázorněn věk uvedený v měsících. Silnější čarou je znázorněn medián, u dívek 42 měsíců a u chlapců 33 měsíců. Minimum u dívek je 7 měsíců a u chlapců 6 měsíců. Odlehlá hodnota u dívek je 157 měsíců, u chlapců 111 měsíců.

U 41 pacientů (93,2 %) se nefroblastom vyskytoval sporadicky. U dvou pacientů byl diagnostikován Denys-Drashův syndrom a u jednoho Fanconiho anémie.

4. Metody

4.1. Izolace DNA z tkáně

4.1.1. Použité chemikálie a zařízení

K izolaci DNA ze vzorků histologicky ověřené nádorové tkáně nefroblastomu byl použit kit od firmy Qiagen Puregene Core Kit A.

Chemikálie:

- Cell Lysis Solution – součást kitu
- Puregene Proteinase K – součást kitu
- RNase A Solution – součást kitu
- Protein Precipitation Solution – součást kitu
- DNA Hydration Solution – součást kitu
- Izopropanol – od firmy PENTA
- 70% ethanol – od firmy PENTA

Přístroje:

- Eppendorf Thermometer Comfort
- Eppendorf Centrifuga 5430 R
- Biosan Combi-Spin Centrifuga/Vortex
- NanoDrop Lite Spektrofotometr

4.1.2 Postup

1. den:

- Odebrat 1-2 mm³ tkáně do 1,5ml zkumavky
- Přidat 300 µl Cell Lysis Solution a zvortexovat
- Přidat 1,5 µl Puregene Proteinase K a 25x invertováním promíchat
- Inkubovat v Thermomixeru Comfort při teplotě 55 °C a 700 rpm tři a více hodin (dokud se tkáň nerozpustí)

2. den:

- Přidat 1,5 µl RNase A Solution a 25x invertováním promíchat
- Inkubovat 30 minut při 37 °C a 300 rpm
- Inkubovat 1 minutu na ledu
- Přidat 100 µl Protein Precipitation Solution a 20 sekund vortexovat
- Centrifugovat 3 minuty při 4 °C a 13200 rpm
- Odebrat supernatant do čisté zkumavky a centrifugovat ho 3 minuty při 4 °C a 13200 rpm

- Napipetovat 300 µl izopropanolu do čisté zkumavky a přidat supernatant z předešlého kroku
- Jemně invertovat 50x nebo do vysrážení bílého viditelného vlákna
- Centrifugovat 2 minuty při 4 °C a 13200 rpm
- Opatrně slít, odsát supernatant do buničiny
- Přidat 300 µl 70% etanolu a promíchat, aby se peleta odlepila ode dna zkumavky
- Centrifugovat 2 minuty při 13200 rpm při pokojové teplotě
- Opatrně slít, odsát supernatant, zkumavky nechat vyschnout
- Přidat 20-100 µl DNA Hydration Solution (podle velikosti pelety) a 5 sekund vortexovat
- Inkubovat 1 hodinu při 65 °C a 300 rpm a poté přes noc při pokojové teplotě

3. den:

- Kvalitu a koncentraci DNA změřit na NanoDrop přístroji

4.2. MLPA (multiplex ligation probe amplification)

4.2.1. Princip metody

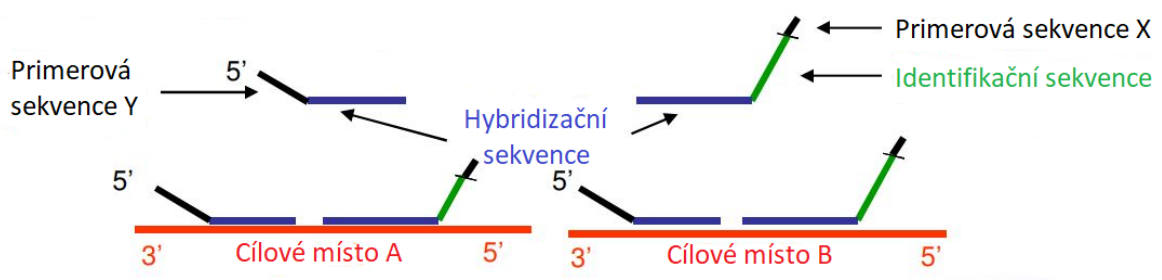
MLPA byla poprvé popsána Schouten, et al. v roce 2002. Je to metoda odvozená od PCR (Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce). Využívá se při ní až 60 sond, které jsou navrženy tak, aby se každá specificky vážala do jednoho cílového místa genomu (dlouhého přibližně 50 až 70 nukleotidů), které chceme vyšetřit. Pomocí MLPA je možné detekovat změny v počtu kopií, tedy zisky nebo delecce (nebalancované změny). Tato metoda není časově náročná (výsledky jsou k dispozici do 24 hodin) a najednou může být vyšetřeno až 96 vzorků (ve kterých jsou však zahrnuty i kontrolní vzorky). Stačí velmi nízké množství DNA (20 ng) a může být využita i částečně degradovaná DNA. (Schouten et al. 2002; MRC-Holland, ©2018; Biogen, ©2018)

MLPA neslouží pouze pro zaznamenání změn v počtu kopií, ale dokáže detekovat i známé bodové mutace nebo SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Další modifikace této metody mohou určit množství mRNA (RT-MLPA – Reverse Transcriptase MLPA) nebo

metylační status DNA (MS-MLPA – Methylation-Specific MLPA). (Eldering et al. 2003; Nygren et al. 2005; Schouten et al. 2002)

MLPA se skládá z několika navazujících kroků: denaturace DNA, hybridizace sond do cílových míst, ligační reakce, PCR reakce, separace amplifikovaných produktů (kapilární elektroforéza) a nakonec analýza dat.

V prvním kroku je DNA denaturována, aby k ní mohly být navázány próby. Ty se skládají ze dvou oligonukleotidů, které nasedají na DNA těsně vedle sebe. První z oligonukleotidů je kratší a složený z hybridizační sekvence na 3' konci a ze sekvence sloužící jako primer na 5' konci. Druhý oligonukleotid obsahuje také hybridizační (na 5' konci) a primerovou (na 3' konci) sekvenci, ale mezi nimi je dále identifikační úsek o variabilní délce. Je využíván jen jeden pár primerů, který je u všech sond stejný. Jeden z dvojice primerů je fluorescenčně značený. Každá sonda zahrnuje různě dlouhý identifikační úsek, což na konci umožňuje rozeznat od sebe amplifikované produkty. (Schouten et al. 2002; MRC-Holland, ©2018)

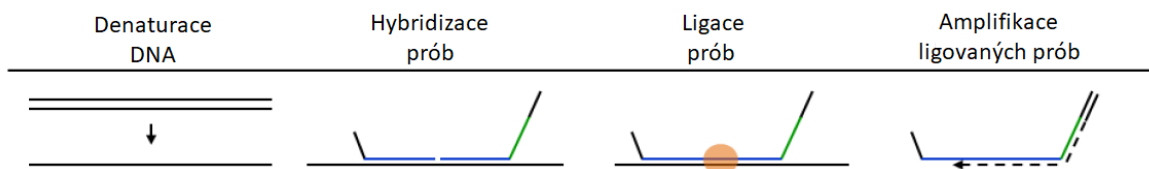


Obr. 3: Sondy pro MLPA

Na obrázku jsou zobrazeny dva oligonukleotidy tvořící jednu sondu. Nahoře vlevo je oligonukleotid tvořený primerovou a hybridizační sekvencí, vpravo ten, který navíc obsahuje identifikační sekvenci. Dole jsou znázorněna dvě cílová místa na DNA a způsob, jakým sondy nasedají. Sondy v těchto místech jsou odlišeny různou délkou identifikační sekvence. (Schouten et al. 2002; upraveno)

V případě, že oligonukleotidy správně nasednou vedle sebe, dochází k jejich ligaci během ligační reakce. Následně přichází na řadu PCR reakce, během níž jsou zligované sondy amplifikovány. Na rozdíl od klasické PCR není v tomto případě amplifikována

vyšetřovaná DNA, ale navázané sondy. Amplifikované produkty jsou poté separovány podle délky pomocí kapilární elektroforézy. Sondy jsou navrženy tak, že mají výsledné amplikony délku od 130 do 480 nt (díky variabilnímu úseku je možné od sebe odlišit amplifikované produkty z různých vyšetřovaných míst genomu). (Schouten et al. 2002; MRC-Holland, ©2018)

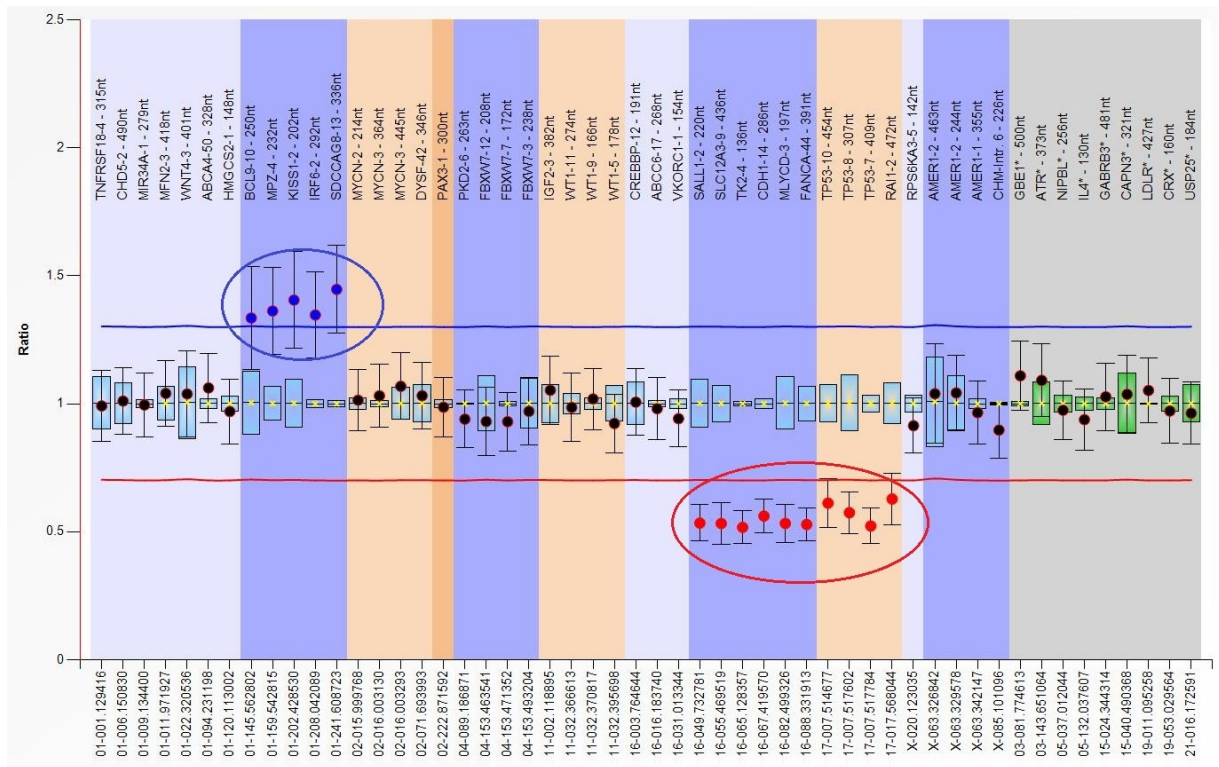


Obr. 4: Přehled jednotlivých kroků MLPA (Biogen, ©2018; upraveno)

Analýza dat probíhá na základě elektroforeogramu získaného kapilární elektroforézou. Každý z vrcholů znázorňuje jednu sondu, tedy množství amplifikovaných produktů jedné sondy. Relativní výšky těchto vrcholů v elektroforeogramu vyšetřovaného vzorku jsou porovnávány s interními kontrolními vrcholy, které jsou součástí každého kitu, a zároveň s elektroforeogramem kontrolního vzorku, ve kterém nejsou ve vyšetřovaných místech přítomny změny v počtu kopií. Proto je výhodou využít softwarové zpracování.

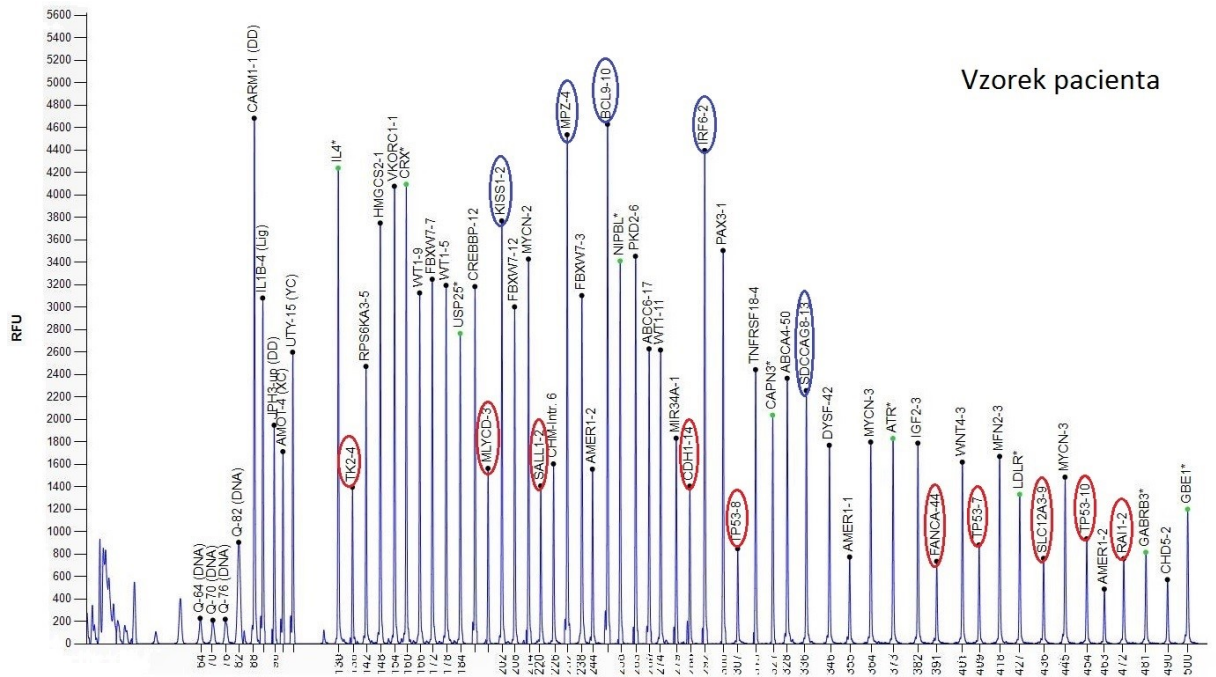
Je-li ve vyšetřovaném vzorku na jednom chromozomu přítomna delece, nasedají sondy pouze na druhý chromozom a výsledné množství amplifikovaných produktů je nižší. Tím pádem je nižší i vznikající vrchol. Naopak, je-li přítomen zisk, naváže se větší množství sond, výsledných amplifikovaných produktů je více a vzniklý vrchol je vyšší než u kontrolního vzorku. (Schouten et al. 2002; MRC-Holland, ©2018)

My jsme k analýze dat použili program Coffylazer.net.

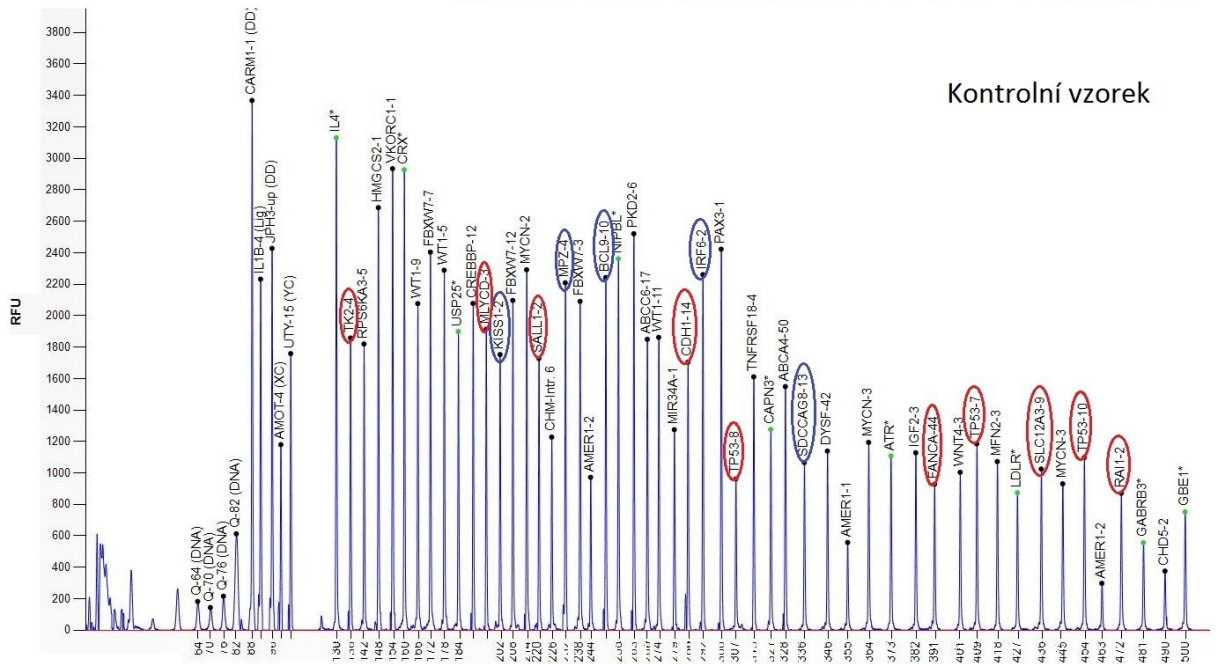


Obr. 6: Výstup z programu Coffalyzer.net pacienta se změnami

Na ose x jsou uvedeny jednotlivé sondy, na ose y je hodnota daná intenzitou fluorescence. Modré a zelené boxy udávají 95% interval spolehlivosti daný kontrolními vzorky. Černé body znázorňují ratio každé próby a paprsky jdoucí z těchto bodů znázorňují 95% interval spolehlivosti každé próby ve vyšetřovaném vzorku. Modrá a červená linka určují hranice, které jsou umístěny +/- 0,3 od průměrné hodnoty kontrolních vzorků každé sondy. Překročili-li body tuto hranici, je pravděpodobné, že je přítomna změna. U tohoto pacienta byl zachycen zisk 1q, delece 16q a delece 17p. Geny, které se nachází vpravo v šedém poli slouží jako interní kontroly.



Vzorek pacienta



Kontrolní vzorek

Obr. 7: Porovnání elektroforeogramů vzorku pozitivního na změny s jedním z kontrolních vzorků

Na ose x je zaznamenána délka (v bp) vznikajících fragmentů DNA rozdělených při kapilární elektroforéze, na ose y je zaznamenána intenzita fluorescence (RFU = relative fluorescence unit - relativní fluorescenční jednotka). Každý vrchol patří k jedné MLPA sondě. Modře jsou zvýrazněny sondy, kterými byl zachycen ve vzorku pacienta zisk

a červeně ty, které zachytily delecí. Vzorek pacienta, ze kterého byl vytvořen horní elektroforeogram, je ten samý, ze kterého byl vytvořen výstup na obr. č. 6 výše. Je vidět, že u pacienta je fragmentů DNA zaznamenaných modře značenými sondami větší množství (je tam zisk) a červenými sondami nižší množství (je tam delece).

4.2.2. Použité chemikálie a zařízení

K této metodě jsme použili kit SALSA MLPA probemix P380-B1 zakoupený od firmy MRC-Holland. Tento kit je navržen přímo pro nefroblastomy a obsahuje celkem 53 prób. Některé próby se specificky váží do chromozomálních oblastí 1p (7 prób), 1q (5 prób), 16p (3 próby) a 16q (6 prób). Další sondy jsou situovány do oblastí genů *MYCN* v regionu 2p24.3 (3 próby), *FBXW7* na 4q31.3 (3 próby), *WT1* na 11p13 (3 próby), *TP53* na 17p13.1 (3 próby) a *AMER1 (WTX)* na Xq11.2 (3 próby). Dále jsou zahrnuty sondy, které ohraničují předchozí (na 2p, 2q, 4q, 11p, 17p, Xp a Xq) pro lepší určení rozsahu změn. V kitu je také obsaženo 10 referenčních sond vázících se na různá místa v genomu, která bývají v nefroblastomech relativně stabilní, co se týče počtu kopií.

Chemikálie:

- TE (10 mM Tris/1 mM EDTA) - lékárna FNM
- SALSA MLPA Buffer – součást kitu
- SALSA MLPA Probe mix – součást kitu
- Ligase buffer A a Ligase buffer B – součást kitu
- Ligase enzym-65 – součást kitu
- SALSA PCR Primer mix – součást kitu
- SALSA Polymerase – součást kitu
- HiDi™ Formamid – od firmy Applied Biosystems
- Gene Scan – od firmy Applied Biosystems
- dH₂O

Přístroje:

- SensoQuest Labcycler – termocykler

- Eppendorf Research pipety (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl a 100-1000 µl)
- AppliedBiosystems/Hitachi 3130xl Genetic Analyzer - sekvenátor

4.2.3. Postup

1. den:

Denaturace DNA a hybridizace prób

- Naředit DNA na koncentraci 50-150 ng v TE pufru do objemu 2,5 µl pro každý vzorek
- Dát vzorky do termocykleru a 5 minut zahřívát při 98 °C, zchladit na 25 °C a až poté otevřít termocykler
- Připravit hybridizační master mix: Pro každý vzorek 0,75 µl SALSA Probe mix a 0,75 µl MLPA buffer
- Přidat 1,5 µl master mixu ke každému vzorku a pipetou promíchat
- Inkubovat v termocykleru 1 minutu při 95 °C a poté 16-20 hodin při 60 °C

2. den:

Ligační reakce

- Připravit Ligase-65 master mix: Pro každý vzorek 12,5 µl dH₂O, 1,5 µl Ligase buffer A, 1,5 µl Ligase buffer B a 0,5 µl Ligase enzym-65
- Snížit teplotu termocykleru na 54 °C
- Přidat 16 µl Ligase-65 master mixu ke každému vzorku a pipetou jemně promíchat
- Inkubovat 15 minut při 54 °C, poté zahřát na 98 °C a ponechat 5 minut
- Ochladit na 20 °C a vyndat

PCR reakce

- Připravit Polymerase master mix na ledu: Pro každý vzorek 3,75 µl dH₂O, 1 µl SALSA PCR primer mixu a 0,25 µl SALSA polymerase
- Při pokojové teplotě přidat ke každému vzorku 5 µl polymerase master mixu a pipetou jemně promíchat
- Dát vzorky do termocykleru na program PCR: 35 cyklů – 30 sekund při 95 °C, 30 sekund při 60 °C a 1 minutu při 72 °C

- Poté nechat 20 minut při 72 °C

Příprava vzorku na fragmentační analýzu

- Připravit master mix FormamidHiDi: Pro každý vzorek 12 µl formamidu a 0,5 µl Gene scan
- Napipetovat master mix formamid do jamek destičky pro sekvenaci – podle počtu vzorků, do každé jamky 12 µl
- Do každé jamky přidat 1 µl MLPA produktu

Analýza vzorku

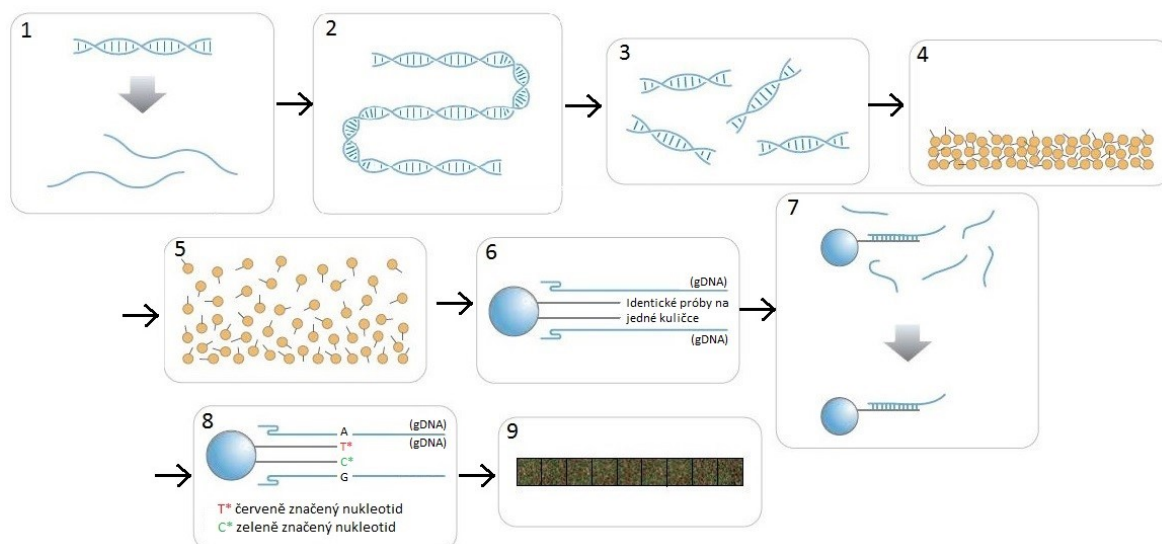
- Destičku se vzorky vložit do přístroje AppliedBiosystems/Hitachi 3130xl Genetic Analyzer, kde proběhne kapilární elektroforéza
- Analyzovat v počítačovém programu Coffalyzer.net

4.3. SNP array

4.3.1. Princip metody

SNP array je metoda umožňující vyšetřit celý genom při jednom vyšetření. Zároveň jsme schopni na jednom čipu vyšetřit paralelně více vzorků. Původně byla SNP array navržena pro genotypizaci lidské DNA, ale dnes se používá i k zachycení změn v počtu kopií (delece, duplikace, amplifikace), dále na kopie neutrálních LOH (UPD – uniparentální dizomie). Pomocí SNP array není možné zaznamenat balancované změny, např. translokace nebo inverze. Tato metoda vyžaduje 200 ng vstupní DNA vzorku. Využívá přítomnosti SNP (Single Nucleotide Polymorphism - jednonukleotidové polymorfismy), což jsou jednonukleotidové variace nacházející se po celém genomu. (Thureau 2009)

SNP array je časově náročnější metoda, k jejímu provedení jsou třeba 3 dny. Celý proces se skládá z několika po sobě následujících kroků: 1. Amplifikace DNA; 2. Inkubace DNA; 3. Fragmentace DNA; 4. Precipitace DNA; 5. Resuspendace DNA; 6. Hybridizace k čipu; 7. Promytí čipu; 8. Jednonukleotidová extenze a značení; 9. Zobrazení (skenování) čipu; 10. Analýza výsledků



Obr. 8: Jednotlivé kroky SNP array

Malé obrázky jsou číslovány stejně jako kroky v předešlém textu. Na obrázku ke kroku 8 jsou znázorněny dvě odlišné alely. Díky nim vydávají oligonukleotidy po jednonukleotidové extenzi barevně odlišný signál. (Infinium® HD Assay Super Protocol Guide, 2015; upraveno)

V prvním kroku je DNA připravována pro amplifikaci. Dochází k její denaturaci a neutralizaci. Během inkubace, která probíhá přes noc, dochází k izotermické amplifikaci DNA. Amplifikovaná DNA je fragmentována (naštěpena pomocí enzymů). Poté je DNA precipitována (dochází k jejímu srážení) a resuspendována v hybridizačním pufru. Takto připravená DNA už může být hybridizována na čip. Na čipu je přítomné velké množství kuliček, na které jsou navázané oligonukleotidy (50 nt dlouhé). Na každé kuličce jsou jiné oligonukleotidy a odpovídá jednomu lokusu v genomu. Na tyto oligonukleotidy se specificky naváže fragmentovaná DNA.

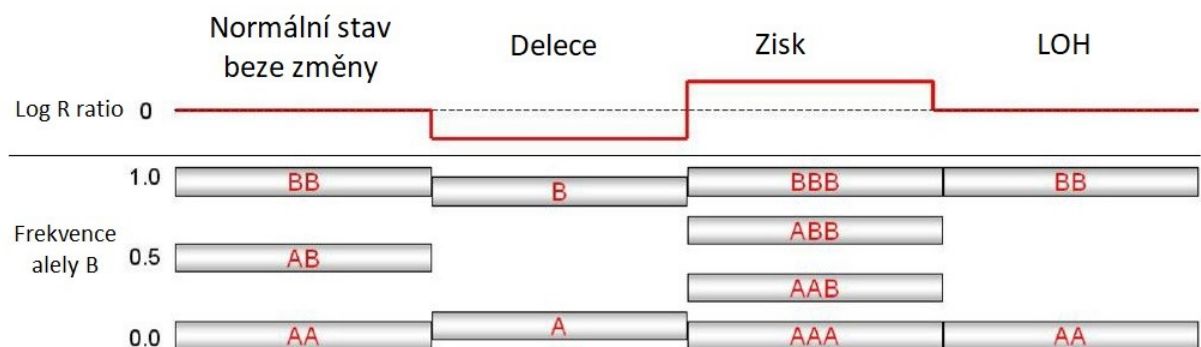
Dalším krokem je promytí čipu, při kterém je odstraněna nehybridizovaná nebo nespecificky hybridizovaná DNA. Po odmytí dochází k jednonukleotidové extenzi, což znamená, že oligonukleotidy přítomné na čipu jsou prodlouženy o jeden nukleotid, který je fluorescenčně značený. Je připojen vždy nukleotid, který je komplementární k hybridizovanému fragmentu DNA (hybridizovaná DNA je použita jako templát). Následně je čip naskenován. Skener používá lasery, které excitují fluorofory ze značených

nukleotidů na jednotlivých kuličkách, a na jejich základě jsou vytvořeny chromozomové mapy. Data z těchto map jsou poté analyzována. (Infinium® HD Assay Super Protocol Guide, 2015; LaFramboise 2009; Thureau 2009)

Pro vyhodnocení dat jsme použili program BlueFuse Multi (verze 4.3).

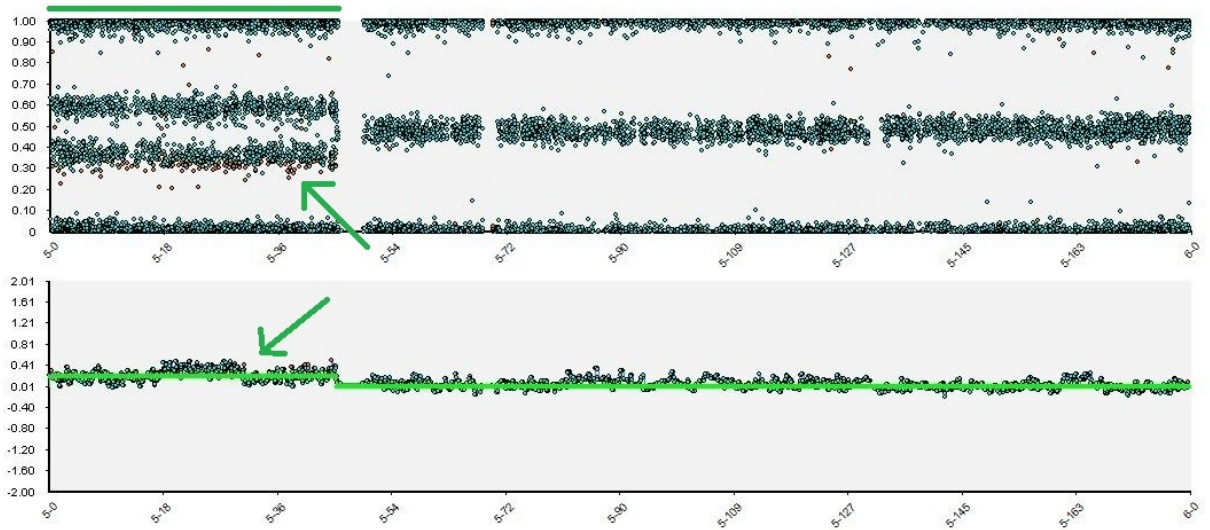
Data jsou programem porovnávána se souborem vzorků 200 zdravých jedinců (kontrol) a vyhodnocena na základě dvou veličin - log R ratio (závisí na intenzitě fluorescence) a frekvence alely B. Log R ratio nabývá hodnot od -2 do 2, kdy 0 znamená normální počet kopií, záporné hodnoty nižší počet kopií (delece) a kladné hodnoty vyšší počet kopií (zisk). Frekvence alely B může být od 0 do 1, kdy 0 značí genotyp AA, 0,5 genotyp AB a 1 genotyp BB. (LaFramboise 2009; Bečvářová et al. 2011)

Pokud je přítomen zisk, frekvence alely B nabývá čtyř různých hodnot, a to 0 (genotyp AAA), 0,33 (genotyp AAB), 0,67 (genotyp ABB) nebo 1 (genotyp BBB). V případě genotypů AAB a ABB vysílá jedna z alel silnější signál a proto je frekvence alely B posunuta z hodnoty 0,5 na 0,33 nebo 0,67. Pokud je přítomna delece, jsou možné jen dva genotypy, a to A nebo B. Frekvence alely B je pak přibližně 0 (A) a přibližně 1 (B), jelikož signál je vydáván pouze jednou alelou. V místě, kde se nachází LOH, je frekvence alely 0 a 1. Jelikož dochází ke ztrátě heterozigosity, není tu v žádném lokusu přítomen genotyp AB (heterozygot), pouze AA a BB. (Gardina et al. 2008)



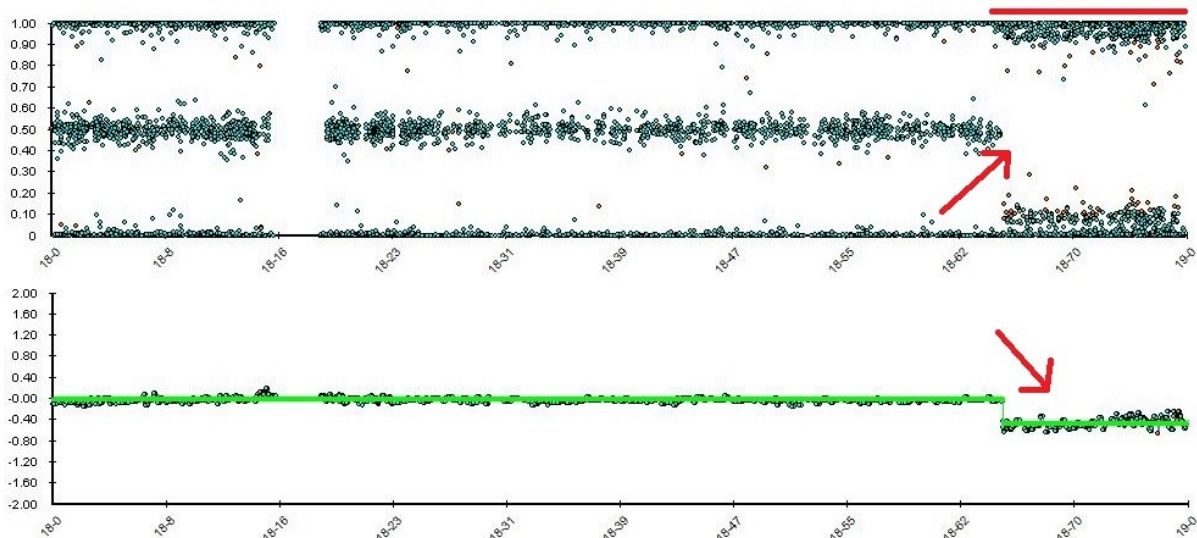
Obr. 9: Znárodnění log R ratio a frekvence alely B při různých změnách (Gardina et al. 2008; upraveno)

Dále jsou uvedeny některé konkrétní případy změn.



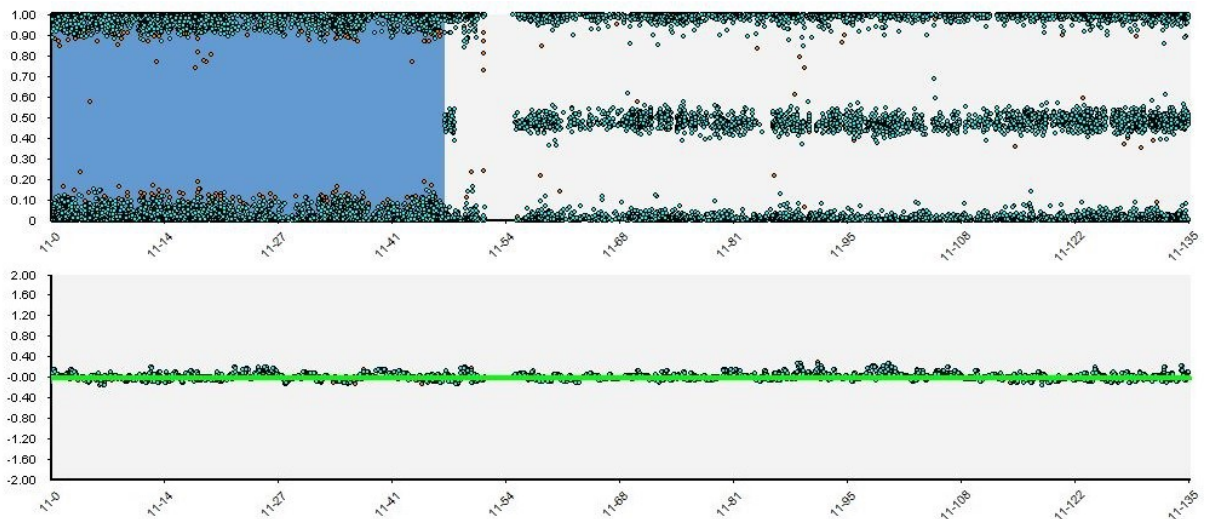
Obr. 10: Zobrazení zisku v programu BlueFuse Multi

Na horním grafu je na ose x pozice na chromozomu, např. 5-18 udává 5. chromozom v místě vzdáleném 18 Mb od počátku krátkého raménka chromozomu. Na ose x je zaznamenána frekvence B alely. Body v grafu naznačují jednotlivá místa SNP markerů. V místě zisku není frekvence alely B rovna 0,5, ale nabývá hodnot 0 (AAA), 0,33 (AAB), 0,67 (ABB) a 1 (BBB). Na dolním grafu je na ose x pozice na chromozomu a na ose y log R ratio. V místě zisku je log R ratio posunuto do kladných hodnot. V tomto případě je přibližně 0,2. Region se ziskem je naznačen šipkami.



Obr. 11: Zobrazení delecí v programu BlueFuseMulti

Na horním grafu je na ose x pozice na chromozomu zadávána jako číslo chromozomu a počet Mb od telomery krátkého raménka. Na ose y je zaznamenána frekvence B alely. Body v grafu naznačují jednotlivá místa SNP markerů. V místě delecí je hodnota frekvence B alely ~ 0 (A) nebo ~ 1 (B). Na dolním grafu je na ose x pozice na chromozomu a na ose y $\log R$ ratio. V místě delecí je $\log R$ ratio posunuto do kladných hodnot. V tomto případě je přibližně $-0,4$. Region s delecí je naznačen šípkami.



Obr. 12: Zobrazení LOH v programu BlueFuseMulti

Na horním grafu je na ose x pozice na chromozomu zadávaná jako číslo chromozomu a počet Mb od telomery krátkého raménka. Body v grafu naznačují jednotlivá místa SNP markerů. V místě LOH je frekvence alely B 0 (při genotypu AA) nebo 1 (při genotypu BB). Na dolním grafu je na ose x pozice na chromozomu a na ose y log R ratio. V místě LOH je log R ratio rovno 0, jelikož nedochází ke změně počtu kopií. Region s LOH je vybarven tmavě modře.

4.3.2. Použité chemikálie a zařízení

Chemikálie:

- ATM – Anti-Stain Two-Color Master Mix – od firmy Illumina
- FMS – Fragmentation solution - od firmy Illumina
- MA1 a MA2 – Multi-Sample Amplification Mix 1 a 2 - od firmy Illumina
- MSM – Multi-Sample Amplification Master Mix - od firmy Illumina
- PB1 – pro přípravu čipu k hybridizaci - od firmy Illumina
- PB2 – pufr - od firmy Illumina
- PM1 - od firmy Illumina
- RA1 - od firmy Illumina
- STM – Superior Two-Color Master Mix - od firmy Illumina
- TEM – Two-Color Extension Master Mix - od firmy Illumina

- XC1, XC2, XC3 a XC4 – XStainBeadChip solution 1, 2, 3 a 4 - od firmy Illumina
- TE – 10 mM Tris/1 mM EDTA – lékárna FNM
- 0,1N NaOH – od firmy Sigma-Aldrich
- 100% 2-propanol – od firmy PENTA
- 95% formamid/1 mM EDTA – formamid od firmy Roche, EDTA z lékárny FNM
- 100% ethanol – od firmy PENTA

Přístroje:

- NanoDrop Lite Spectrophotometer - spektrofotometr
- Eppendorf Centrifuge 5810 R – centrifuga
- SciGene Hybex Microsample Incubator – tepelný blok
- Illumina High Speed Microplate Shaker – vortex
- Illumina Hybridization Oven – hybridizační pec
- Thermo Scientific ALPS 25 Manual Heat Sealer – žehlička
- VWR Programmable Temperature Controller – vodní lázeň
- Omega Engineering inc. 869C Thermometer – termometr
- Vacubrand MZ 2 NT – vakuová pumpa
- Nichipet EXII – pipety (objemy 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l)
- Illumina iScan – skener čipu

4.3.3. Postup

1. den:

Denaturace a neutralizace vzorků, inkubace

- Naředit DNA vzorky pomocí TE na koncentraci mezi 40-70 ng/ μ l
- Do titrační desky napipetovat 4 μ l vzorků DNA do vybraných jamek
- Do každé jamky přidat 20 μ l MA1 a poté 4 μ l 0,1 N NaOH
- Destičku uzavřít víčkem a vortexovat 1 minutu při 1600 rpm
- Centrifugovat 1 minutu při 280 xg, poté nechat 10 minut inkubovat při pokojové teplotě
- Do každé jamky přidat 68 μ l MA2 a poté 75 μ l MSM

- Opět uzavřít víčkem, vortexovat 1 minutu při 1600 rpm a centrifugovat 1 minutu při 280 xg
- Inkubovat v hybridizační peci předežhřáté na 37°C do druhého dne (20-24 hodin)

2. den:

Fragmentace DNA

- Vyndat destičku z hybridizační pece a centrifugovat 1 minutu při 50 xg
- Opatrně sundat víčko a přidat do každé jamky 50 µl FMS
- Uzavřít víčkem a vortexovat 1 minutu při 1600 rpm
- Centrifugovat 1 minutu při 50 xg a 22 °C
- Inkubovat 1 hodinu v tepelném bloku při 37 °C

Precipitace DNA

- Destičku vyndat z tepelného bloku a odvíčkovat
- Do každé jamky napipetovat 100 µl PM1
- Uzavřít víčkem a vortexovat 1 minutu při 1600 rpm
- Inkubovat 5 minut při 37 °C
- Centrifugovat 1 minutu při 50 xg a 22 °C
- Do každé jamky přidat 300 µl 100% 2-propanolu
- Uzavřít novým suchým víčkem a nejméně 10x destičku invertovat
- Inkubovat 30 minut při 4 °C
- Centrifugovat 20 minut při 3000 xg a 4 °C
- Okamžitě po skončení centrifugace destičku vyndat, sundat víčko a rychlým otočením slít supernatant
- Po dobu 1 minuty (dokud nejsou jamky zbavené tekutiny) poklepávat destičkou o absorpční podložku
- Otočenou destičku nechat na stojánku 1 hodinu schnout

Resuspendace DNA

- Po uschnutí destičky přidat do každé jamky se vzorkem 46 µl RA1
- Pomocí žehličky přivařit na destičku fólii

- Inkubovat 1 hodinu v hybridizační peci při 48 °C
- Vortexovat 1 minutu při 1800 rpm a poté pulzně centrifugovat při 280 xg

Hybridizace na čipu

- Do hybridizační komůrky vložit hybridizační košík a do všech pufrových rezervoárů napipetovat 400 µl PB2
- Destičku se vzorky nechat 20 minut v tepelném bloku při 95 °C
- Nechat 30 minut při pokojové teplotě a poté pulzně centrifugovat při 280 xg
- Umístit čip do komůrky a napipetovat na něj 43 µl od každého vzorku
- Hybridizační komůrku s čipem uzavřít a dát na 16-24 hodin do hybridizační pece při 48 °C
- Resuspendovat XC4 přidáním 330ml 100% ethanolu a důrazným promícháním

3. den:

Promytí čipu

- Vyndat hybridizační komůrku z hybridizační pece a nechat 25 minut vychladnout
- Naplnit 2 misky PB2, do každé 200 ml
- Vyndat čip z komůrky a sundat z něj fólii
- Umístit čip do promývacího držáku, ponořit ho do první misky a 1 minutu s ním pomalu pohybovat nahoru a dolů
- Poté ponořit do druhé misky a opět 1 minutu pohybovat nahoru a dolů
- Naplnit Multi-Sample BeadChip krabičku 150 ml PB1 a vložit do ní čip, poté překrýt spacerem a čistým promývacím sklíčkem a zajistit svorkami
- Takto zajištěný čip umístit do průtokové lázně nastavené na 44 °C

Odmytí nehybridizované DNA, přidání značených nukleotidů

- Do rezervoáru na čipu napipetovat 150 µl RA1 a inkubovat 30 s, tento krok pětkrát opakovat
- Napipetovat 450 µl XC1 a inkubovat 10 minut
- Napipetovat 450 µl XC2 a inkubovat 10 minut
- Napipetovat 200 µl TEM a inkubovat 15 minut

- Napipetovat 450 µl 95%formamidu a inkubovat 1 minutu, ještě jednou zopakovat a poté inkubovat dalších 5 minut
- Začít snižovat teplotu lázně na 37 °C
- Napipetovat 450 µl XC3 a inkubovat 1 minutu, krok jednou zopakovat a čekat, dokud se teplota neustálí na 37 °C
- Napipetovat 250 µl STM a inkubovat 10 minut
- Napipetovat 450 µl XC3 a inkubovat 1 minutu, jednou zopakovat a poté čekat dalších 5 minut
- Napipetovat 250 µl ATM a inkubovat 10 minut
- Napipetovat 450 µl XC3 a inkubovat 1 minutu, jednou zopakovat a poté čekat dalších 5 minut
- Napipetovat 250 µl STM a inkubovat 10 minut
- Napipetovat 450 µl XC3 a inkubovat 1 minutu, jednou zopakovat a poté čekat dalších 5 minut
- Napipetovat 250 µl ATM a inkubovat 10 minut
- Napipetovat 450 µl XC3 a inkubovat 1 minutu, jednou zopakovat a poté čekat dalších 5 minut
- Napipetovat 250 µl STM a inkubovat 10 minut
- Napipetovat 450 µl XC3 a inkubovat 1 minutu, jednou zopakovat a poté čekat dalších 5 minut
- Okamžitě vyndat čip z promývací lázně a umístit horizontálně na laboratorní stůl
- Naplnit jednu plastovou promývací nádobu 310 ml PB1
- Vyndat čip z konstrukce, umístit ho do promývacího držáčku a 10x ho ponořovat v PB1, poté ho nechat 5 minut máčet
- Naplnit druhou plastovou nádobu 310 ml XC4 (nejprve láhev s ním pořádně promíchat)
- Držákem s čipem 10x ponořovat v XC4 a poté nechat máčet 5 minut
- Vyndat čip a 50 – 55 minut nechat vakuově sušit v desikátoru

Naskenování čipu

- Čip vložit do Illumina iScan Reader a přes počítač spustit skenování

- Vyhodnotit výsledky v programu BlueFuse Multi (verze 4.3)

4.4. Statistické zpracování

Ke statistickému zpracování jsme využili několik statistických testů. Ke zjištění asociací chromozomálních změn s klinickými daty jsme použili Mann-Whitney test a Fisherův exaktní test (v programech R a Statistica 13) a loglineární modelování (v programu NCSS 12). Normalitu dat jsme ověřili Shapiro-Wilkovým testem (Statistica 13).

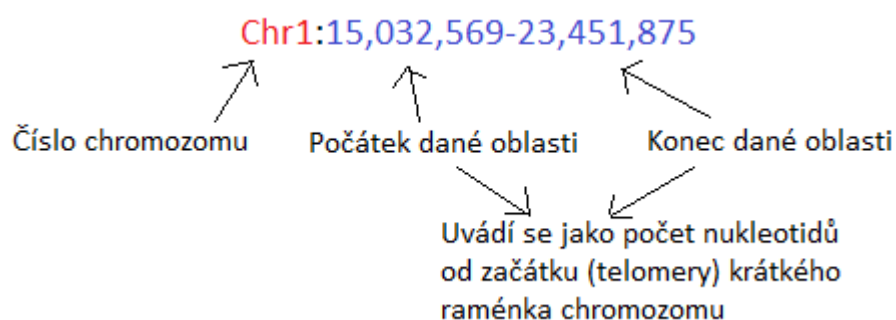
Pro získání grafů a dat přežití jsme využili program SPSS 16, ve kterém jsme použili Kaplan-Meierovu metodu a log rank (Mantel-Coxův test).

Pro ověření shody metod jsme použili McNemarův test hypotézy o symetrii (v programu NCSS 12).

Všechny hypotézy jsme testovali na 5% hladině významnosti.

4.5. Genomické koordináty

V práci (konkrétně v kapitole výsledků ke shodě metod MLPA a SNP array) jsme použili genomické koordináty pro určení lokace zisků a delecí a místa nasedání MLPA prób. Tyto koordináty jsou zapsány v tomto formátu:



Firma MRC Holland uvádí genomické koordináty podle genomové mapy NCBI36/hg18 z roku 2006, zatímco program BlueFuse Multi, ve kterém se zpracovávají výsledky SNP array, pracuje s genomickými koordináty podle GRCh37/hg19 z roku 2009.

Tyto dvě genomové mapy se od sebe trochu liší, např. jsou tam posunuty lokace genů. Příkladem je gen *MYCN*. Podle NCBI36/hg18 se nachází na chr2:15,998,134-16,004,580, ale podle GRCh37/hg19 na chr2:16,080,683-16,087,129.

Abychom mohli metody porovnávat, převedli jsme lokace MLPA sond do GRCh37/hg19. Všechny genomické koordináty v této práci jsou tedy uvedeny podle této genomické mapy. K převodu jsme využili nástroj Lift Genome Annotations, který je dostupný na oficiálních stránkách Kalifornské univerzity Santa Cruz (Lift Genome Annotations, ©2000-2018) a genomické koordináty genů jsme získali také z této stránky (University of California Santa Cruz, ©2000-2018).

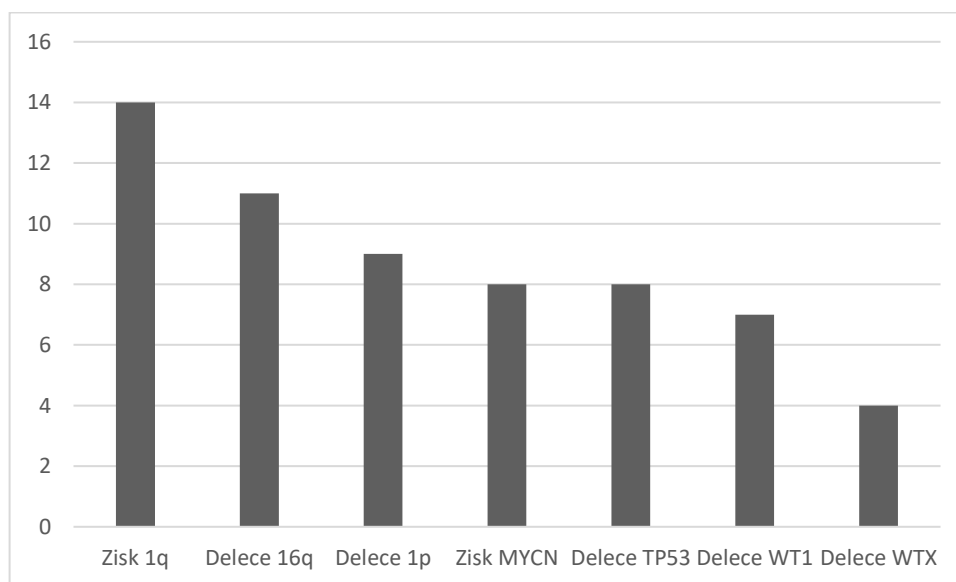
5. Výsledky

V této práci jsme se zaměřili na změny, při kterých dochází ke změně množství genetického materiálu, tedy zisky nebo ztráty (delece) chromozomů nebo jejich částí. Vzhledem k použitým vyšetřovacím metodám nebylo možné určit balancované změny (např. translokace).

5.1. Analýza přítomných změn

Do celkové analýzy přítomných změn na chromozomech jsme zařadili vzorky od všech 44 pacientů, jelikož jsme od všech měli k dispozici data získaná metodou SNP array, byl tedy u nich vyšetřen celý genom.

Zaměřili jsme se především na vybrané změny, které jsou blíže popsány v úvodu a které jsou důležité při prognóze onemocnění nebo jsou např. asociovány s některým histologickým typem. Z těchto změn byl nejvyšší výskyt zaznamenán u zisku 1q. Ten byl přítomen u 14 pacientů (31,8 %). Delece 16q se vyskytovala u 11 pacientů (25 %), delece 1p u 9 pacientů (20,45 %), zisk genu *MYCN* a delece genu *TP53* u 8 pacientů (18,2 %), delece genu *WT1* u 7 pacientů (15,9 %) a delece genu *WTX* u 4 pacientů (9,1 %). Četnosti těchto vybraných změn jsou znázorněny v následujícím grafu.



Graf 2: Četnosti vybraných změn

V šesti nádorech byl zastižen zároveň zisk genu *MYCN* a delece genu *TP53*, ve dvou případech v blastémových nefroblastomech, v jednom nekrotickém a ve třech

anaplastických (v 75 % anaplastických nefroblastomů). V posledním anaplastickém tumoru nebyla zaznamenána ani jedna z těchto změn.

Dále byla u 14 pacientů (31,8 %) přítomna delece v oblasti 17q, u 13 pacientů (29,6 %) zisk Xq, u 11 pacientů (25 %) delece 7p a delece 22q, u 10 pacientů (22,7 %) zisk 7q a zisk 12q a u 9 pacientů (20,45 %) zisky v oblastech 2p (z toho 8 zahrnovalo gen *MYCN*) a 12p a delece v oblastech 4q, 11p (z toho 7 zahrnovalo gen *WT1*), 14q a 16p. Četnosti všech změn jsou shrnuty v tabulce č. 25 a grafu č. 7 v příloze.

V našem vzorku pacientů byly zaznamenány i trizomie. Trizomie 8. chromozomu byla přítomna u 7 pacientů (15,9 %), trizomie 6. chromozomu a 12. chromozomu u 4 pacientů (9,1 %).

U pacientů se ziskem 1q se často vyskytovaly i delece 1p nebo 16q. Zisk 1q byl přítomen u 14 pacientů. U 9 z nich (64 %) byla nalezena alespoň jedna z těchto delecí, z toho pouze delece 1p byla zaznamenána u 4 pacientů, pouze delece 16q u 2 pacientů a obě delece u 3 pacientů. U jednoho pacienta byla však delece 1p nalezena v jiném vzorku (z jiného místa nádoru) než zisk 1q.

Celkem byla společná delece 1p a 16q (bez ohledu na přítomnost zisku 1q) nalezena u 4 pacientů, z nichž u jednoho došlo k relapsu onemocnění a jeden se v současné době léčí s primárním nádorem.

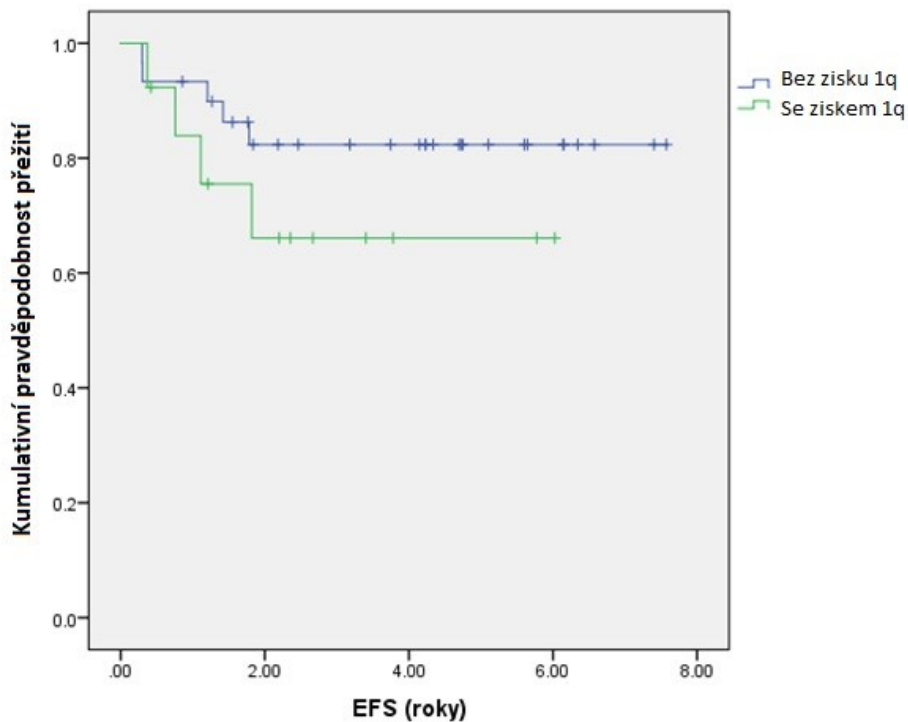
5.1.1. Analýza přežití

Vzhledem k vysokému počtu pacientů, u kterých jsme zaznamenali zisk 1q, který je spojován s horší prognózou, jsme vytvořili grafy přežití, abychom zjistili, zda jsou hodnoty přežití nižší u pacientů s touto změnou. Pacienty jsme rozdělili do dvou skupin. První skupinu tvořili ti, kteří měli v nádoru přítomný zisk 1q, a druhou ti, kteří ho neměli. Tyto dvě skupiny jsme mezi sebou porovnávali.

Abychom získali data přežití, použili jsme Kaplan-Meierovu metodu a vytvořili grafy přežití. Metodu jsme použili k získání dvou různých hodnot, a to EFS (event-free survival - přežití bez událostí, tedy relapsů) a OS (overall survival - celkové přežití).

Kaplan-Meierova metoda je založena na pozorovaných časech přežití jednotlivých pacientů. Tyto časy jsou dány počátkem (tím je v našem případě diagnóza onemocnění) a konečnou událostí (tou je smrt (nebo relaps) nebo poslední záznam o kontrole pacienta). (Segers et al. 2013)

Vytvořili jsme dva grafy, na prvním jsou znázorněny křivky pro EFS obou skupin pacientů a na druhém OS obou skupin pacientů.

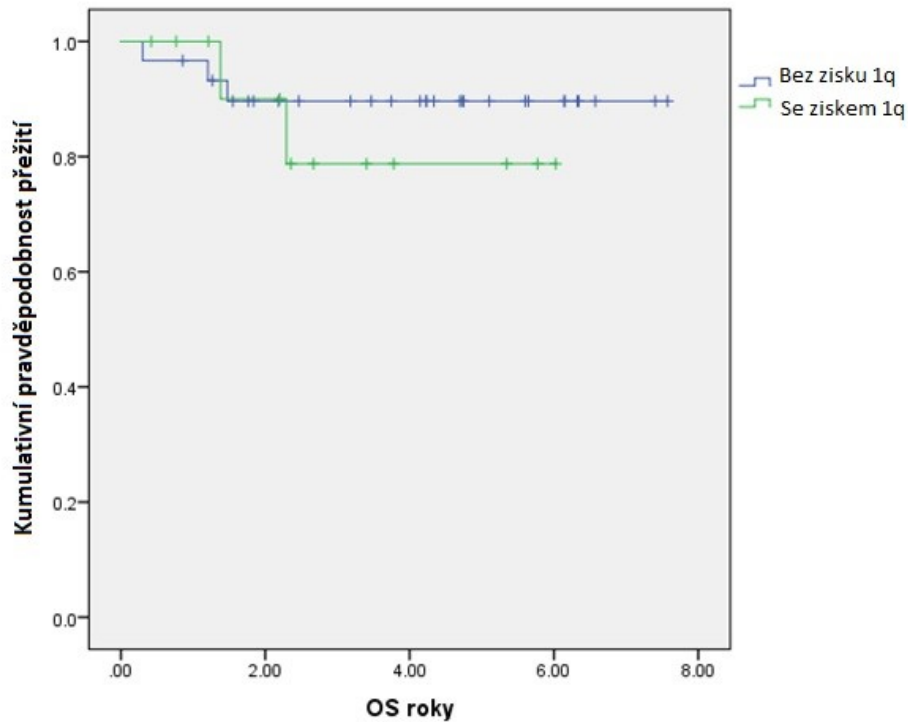


Graf 3: EFS obou skupin pacientů

Na ose x je znázorněna doba přežití (v letech) a na ose y kumulativní pravděpodobnost přežití (pravděpodobnost přežití daného souboru pacientů), kdy hodnota 1,0 udává 100 %. Zelená linka patří skupině pacientů se ziskem 1q a modrá pacientům bez této změny. Každý pokles zaznamenává událost (relaps onemocnění). Každé + na linkách udává délku přežití jednoho pacienta.

Výsledná hodnota EFS pro skupinu se ziskem 1q je 69,2 % a pro skupinu bez zisku 83,3 %. EFS pro skupinu se ziskem 1q je nižší, proto jsme použili log-rank test

(Mantel-Coxův test), který je založen na srovnání očekávaných a pozorovaných počtů pozorování ve skupinách pacientů, abychom zjistili, zda je tento rozdíl signifikantní. Vyšla nám hodnota $p = 0,27$, což znamená, že přítomnost zisku 1q statisticky významně nesnižuje hodnotu EFS.

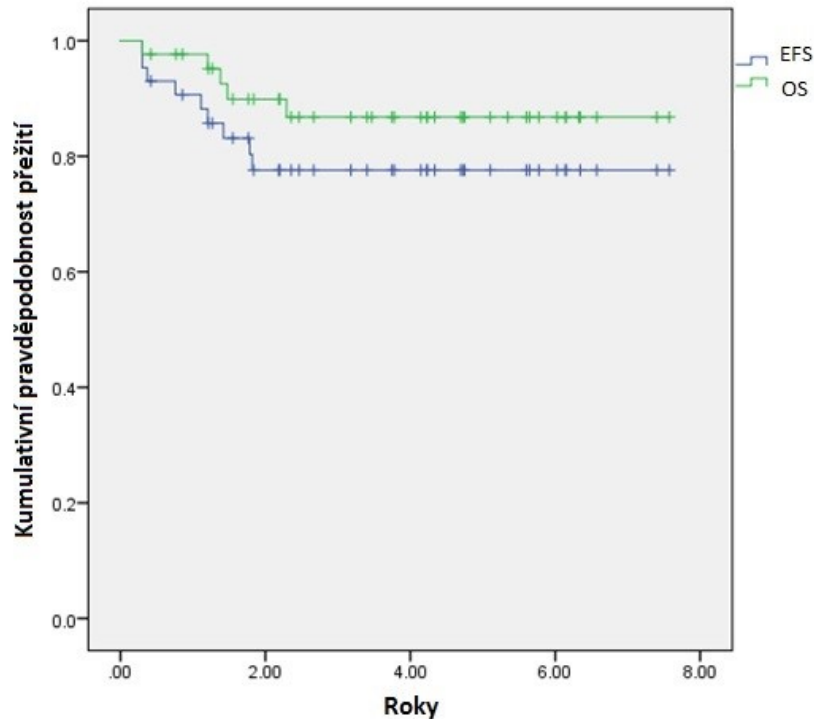


Graf 4: OS obou skupin pacientů

Na ose x je znázorněna doba přežití (v letech) a na ose y kumulativní pravděpodobnost přežití (pravděpodobnost přežití daného souboru pacientů), kdy hodnota 1,0 udává 100 %. Zelená linka patří skupině pacientů se ziskem 1q a modrá pacientům bez této změny. Každý pokles je dán smrtí některého z pacientů. Každé + na linkách udává délku přežití jednoho pacienta.

Výsledná hodnota OS pro skupinu se ziskem 1q je 84,6 % a pro skupinu bez zisku 90 %. OS pro skupinu se ziskem 1q je také nižší, proto jsme opět použili Mantel-Coxův test. Také pro hodnotu OS nám nevyšel statisticky signifikantní výsledek ($p = 0,546$).

Zároveň jsme získali Kaplan-Meierovou analýzou hodnoty EFS a OS pro soubor všech pacientů, bez dělení do jakýchkoliv skupin, kdy EFS = 79,1 % a OS = 88,4 %.



Graf 5: EFS a OS celého souboru pacientů

Na ose x je znázorněna doba přežití (v letech) a na ose y kumulativní pravděpodobnost přežití (pravděpodobnost přežití daného souboru pacientů), kdy hodnota 1,0 udává 100 %. Modrá linka znázorňuje EFS a zelená OS. Každý pokles je dán relapsem onemocnění (pro EFS) nebo smrtí pacienta (pro OS). Každé + na linkách udává délku přežití jednoho pacienta.

5.1.2. Asociace vybraných změn s věkem pacientů v době diagnózy

U všech 44 pacientů jsme testovali závislost vybraných chromozomálních změn (delece 1p, zisk 1q, zisk *MYCN*, delece *WT1*, delece 16q, delece *TP53* a delece *WTX*) na věku pacientů v době diagnózy. Pro určení závislosti jsme použili neparametrický Mann-Whitneyův test, jelikož věk v době diagnózy nevykazoval normální rozdělení. Tento test v H_0 (nulová hypotéza) předpokládá shodné rozložení (shodnou hodnotu mediánu)

ve dvou skupinách (v tomto případě pacientů s danou změnou a beze změny). Byla použita 5% hladina významnosti ($\alpha = 0,05$).

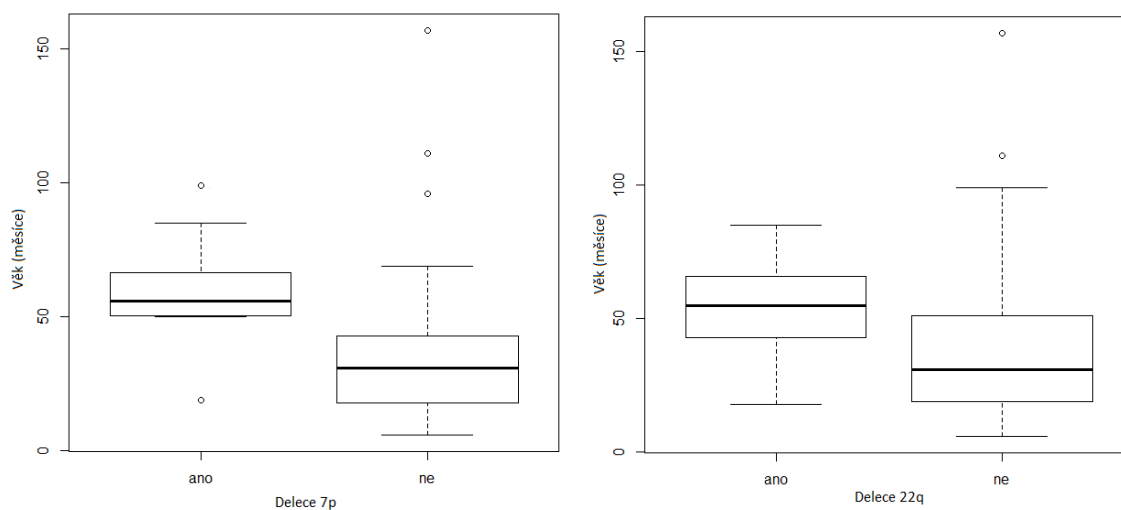
Získané p – hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 3: Výsledné p – hodnoty pro asociaci jednotlivých změn s věkem pacienta v době diagnózy

Změna	p - hodnota
Delece 1p	0,753
Zisk 1q	0,375
Zisk <i>MYCN</i>	0,132
Delece <i>WT1</i>	0,925
Delece 16q	0,248
Delece <i>TP53</i>	0,87
Delece <i>WTX</i>	0,406

U žádné z vybraných změn jsme nezjistili signifikantní výsledek. U všech se tedy potvrdila nulová hypotéza.

Stejný test jsme provedli i u ostatních změn a ve dvou případech jsme našli signifikantní rozdíl. Ten byl nalezen u delece 7p ($p = 0,003$) a delece 22q ($p = 0,02$). V obou případech byli pacienti s přítomnou změnou starší než ti, u kterých změna nebyla prokázána. V případě delece 7p byl medián věku pacientů se změnou 56 měsíců a beze změny 31 měsíců. U delece 22q byl medián věku pacientů se změnou 55 měsíců a beze změny 31 měsíců. Všechny výsledné p – hodnoty jsou uvedeny v souhrnné tabulce č. 26 v příloze.



Graf 6: Asociace delecí 7p a 22q s věkem v době diagnózy

Na levém grafu je uvedena závislost delecí 7p na věku. Medián věku u pacientů s touto změnou je 56 měsíců a u pacientů bez změny 31 měsíců. Na pravém grafu je uveden rozdíl mezi věkem pacientů s delecí 22q (medián je 55 měsíců) a bez ní (medián je 31 měsíců).

5.1.3. Asociace vybraných změn s pohlavím pacientů

Závislost vybraných změn (delece 1p, zisk 1q, zisk *MYCN*, delece *WT1*, delece 16q, delece *TP53* a delece *WTX*) na pohlaví pacientů byla testována u všech 44 pacientů. K vyšetření závislosti byl použit Fisherův exaktní test, u kterého byla formulována nulová hypotéza (H_0), že proměnné (pohlaví a výskyt dané změny) jsou nezávislé. Nulová hypotéza byla testována na 5% hladině testu.

Četnosti změn v závislosti na pohlaví a výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 4: Četnosti vybraných změn v závislosti na pohlaví

Změna	Dívky		Chlapci		p - hodnota
	+	-	+	-	
Delece 1p	5	19	4	16	1
Zisk 1q	8	16	6	14	1
Zisk MYCN	5	19	4	16	1
Delece WT1	5	19	2	18	0,428
Delece 16q	6	18	5	15	1
Delece TP53	5	19	3	17	0,71
Delece WTX	5	19	0	20	0,053

Ze získaných p – hodnot je patrné, že u žádné z uvedených změn nebyla signifikantně potvrzena závislost na pohlaví a nebyla vyvrácena H0 o nezávislosti proměnných.

Tuto závislost jsme prověřili i u ostatních změn. Tabulka uvádějící p – hodnoty u všech změn se nachází v příloze (tabulka č. 27). U čtyř změn jsme našli signifikantní rozdíl, a to u delecí 13q (p = 0,025), 22q (p = 0,044) a Xq (p = 0,011) a zisku Xq (p = 0,009). Všechny delece byly asociovány s ženským pohlavím (delece 13q byla přítomna u 6 dívek a žádného chlapce; delece 22q u 9 dívek a 2 chlapců; delece Xq u 7 dívek a žádného chlapce), naopak zisk Xq byl asociován s mužským pohlavím (byl nalezen u 10 chlapců a 3 dívek).

Tab.5: Četnosti změn se signifikantními rozdíly v závislosti na pohlaví

U jednotlivých změn jsou ve sloupcích (+) uvedeny počty pacientů mající danou změnu a ve sloupci (–) ti, u kterých nebyla změna zaznamenána.

Změna	Dívky		Chlapci		p - hodnota
	+	-	+	-	
Delece 13q	6	18	0	20	0,025
Delece 22q	9	15	2	18	0,046
Delece Xq	7	17	0	20	0,011
Zisk Xq	3	21	10	10	0,009

5.1.4. Asociace vybraných změn s histologickým typem tumoru

U vybraných změn (delece 1p, zisk 1q, zisk *MYCN*, delece *WT1*, delece 16q, delece *TP53* a delece *WTX*) jsme testovali také spojitost s histologickým typem, opět u všech 44 pacientů. Vyskytovaly se u nich tumory blastémového, anaplastického, trifázického, nekrotického a epiteliálního typu. Jejich četnosti jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 6: Počty nefroblastomů pacientů podle histologického typu tumoru

Histologický typ	Počet
Blastémový	18
Trifázický	17
Nekrotický	4
Anaplastický	4
Epiteliální	1
Celkem	44

Vzhledem k nízkému zastoupení některých typů nefroblastomů jsme použili pro statistické zpracování loglineární modelování. Opět jsme použili hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ a testovali H_0 , že proměnné jsou na sobě nezávislé.

U žádné změny nevyšel signifikantní výsledek, proto jsme u nich potvrdili nulovou hypotézu. Výsledné p – hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 7: Výsledné p – hodnoty k závislosti vybraných změn na histologickém typu nefroblastomu

Změna	p - hodnota
Delece 1p	0,535
Zisk 1q	0,959
Zisk <i>MYCN</i>	0,147
Delece <i>WT1</i>	0,871
Delece 16q	0,737
Delece <i>TP53</i>	0,076
Delece <i>WTX</i>	0,736

Zisk *MYCN*, který bývá asociován s anaplastickým typem, byl přítomen u 3 trifázických, 3 anaplastických a 2 blastémových nefroblastomů. Delece genu *TP53* u 3 blastémových, 3 anaplastických, 1 trifázického a 1 nekrotického nefroblastomu.

Dále jsme tuto analýzu provedli i pro ostatní změny. Všechny získané *p* – hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 28 v příloze. Signifikantní výsledky vyšly pro deleci 17q (*p* = 0,006) a deleci 22q (*p* = 0,007). Delece 17q byla přítomna v 5 trifázických (22,2 %), 4 anaplastických (100 %) a 2 blastémových (10,5 %) nefroblastomech. Delece 22q byla nalezena v 5 blastémových (26,3 %), 4 anaplastických (100 %) a 2 trifázických (11,1 %) nefroblastomech. V obou případech jsou změny závislé na anaplastickém typu nefroblastomu, jelikož se nacházely ve všech tumorech tohoto histologického typu.

5.1.5. Asociace vybraných změn se stádiem tumoru

Testování závislosti vybraných změn (delece 1p, zisk 1q, zisk *MYCN*, delece *WT1*, delece 16q, delece *TP53* a delece *WTX*) na stádiu tumoru jsme provedli u všech 44 pacientů. Pro analýzu jsme použili loglineární modelování při 5% hladině významnosti. Nulová hypotéza předpokládá nezávislost obou proměnných.

K dispozici jsme měli 24 nefroblastomů I. stádia, 4 II. stádia, 13 III. stádia a 3 IV. stádia.

Tab. 8: Počty nefroblastomů našich pacientů podle stádia

Stádium	Počet
I.	24
II.	4
III.	13
IV.	3

Signifikantní závislost jsme neprokázali pro žádnou z uvedených změn. Výsledné *p* - hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 9: Výsledné p – hodnoty pro asociaci vybraných změn se stádiem onemocnění

Změna	P - hodnota
Delece 1p	0,419
Zisk 1q	0,093
Zisk <i>MYCN</i>	0,88
Delece <i>WT1</i>	0,076
Delece 16q	0,702
Delece <i>TP53</i>	0,873
Delece <i>WTX</i>	0,56

Závislost na stádiu jsme neprokázali ani pro žádnou z ostatních změn, jejichž p - hodnoty se nachází v souhrnné tabulce č. 29 v příloze.

5.2. Srovnání metod MLPA a SNP array

Shodu metod jsme vyšetřovali podle toho, zda byla daná změna zachycena oběma metodami, pouze jednou (buď pouze pomocí MLPA nebo jen SNP array), anebo žádnou z nich. Vybrali jsme proto změny, které byla MLPA schopná zachytit (kit zahrnoval próby pro tato místa): delece 1p, zisk 1q, zisk 2p24.3 (*MYCN*), delece 11p13 (*WT1*), delece 16q, delece 17p13.1 (*TP53*) a delece Xq11.2 (*WTX*). Využili jsme 74 vzorků, u kterých byly provedeny obě metody a bylo tedy možné shodu určit.

Delece 1p

Na krátkém raménku 1. chromozomu je MLPA schopna vyšetřit 7 míst pomocí 7 prób. Tyto próby jsou situovány do oblastí 1p36.33 (konkrétně gen *TNFRSF18*), 1p36.31 (gen *CHD5*), 1p36.22 (geny *MIR34A* a *MFN2*), 1p36.12 (gen *WNT4*), 1p22.1 (gen *ABCA4*) a 1p12 (gen *HMGCS2*).

Tab. 10: Sondy situované do oblasti 1p

Próba	Region	Gen	Délka próby	Přesná oblast na chromozomu (v bp)
1	1p36.33	<i>TNFRSF18</i>	73 nt	1,139,553 - 1,139,625
2	1p36.31	<i>CHD5</i>	76 nt	6,228,245 - 6,228,320
3	1p36.22	<i>MIR34A</i>	63 nt	9,211,814 - 9,211,876
4	1p36.22	<i>MFN2</i>	61 nt	12,049,340 - 12,049,400
5	1p36.12	<i>WNT4</i>	51 nt	22,447,949 - 22,447,999
6	1p22.1	<i>ABCA4</i>	76 nt	94,458,610 - 94,458,685
7	1p12	<i>HMGCS2</i>	64 nt	120,311,479 - 120,311,542

V nálezu této změny se MLPA a SNP array shodovaly u 70 vzorků (94,6 %). Z toho v 9 případech byla delece 1p zaznamenána a u 61 vzorků nebyla. U 4 vzorků (5,4 %), kde se výsledky metod rozcházel, byla delece 1p zaznamenána ve všech případech pouze metodou SNP array.

Tab. 11: Počty vzorků, ve kterých byla nebo nebyla zaznamenána delece 1p jednotlivými metodami

MLPA	SNP array	
	ano	ne
ano	9	0
ne	4	61

Zaměřili jsme se na vzorky, kde se výsledky rozcházel. U dvou SNP array zaznamenal shodné dlouhé delece o délce 120,432,333 párů bazí (bp) v oblasti 1p36.33-p11.2 (chr1:752,566-121,184,898), kterou by měla být MLPA schopna zachytit všemi 7 próbami. Stejná delece byla přítomna u dalších dvou vzorků, kde ji MLPA zaznamenala.

U třetího vzorku byla kratší delece v oblasti 1p36.21-p36.13 o délce 955,973 bp (chr1:15,832,543-16,788,515). Tato delece se nacházela v oblasti mezi 4. a 5. próbou a nemohla být pomocí MLPA nalezena.

V posledním vzorku byly pomocí SNP array zachyceny dvě delece, první o délce 5,978,755 bp v oblasti 1p33-p32.3 (chr1:47,899,897-53,878,651), druhá v regionu 1p31.3

byla dlouhá 2,460,344 bp (chr1:62,896,419-65,356,763). Obě tyto delece se nachází mezi místy, na které se váže 5. a 6. sonda.

Zisk 1q

Na dlouhé raménko 1. chromozomu se váže 5 MLPA prób, konkrétně do oblastí 1q21.2 (gen *BCL9*), 1q23.3 (gen *MPZ*), 1q32.1 (gen *KISS1*), 1q32.2 (gen *IRF6*) a 1q43 (gen *SDCCAG8*).

Tab. 12: Sondy vázající se do oblasti 1q

Próba	Region	Gen	Délka próby	Přesná oblast na chromozomu (v bp)
1	1q21.2	<i>BCL9</i>	70 nt	147,096,178 - 147,096,247
2	1q23.3	<i>MPZ</i>	63 nt	161,276,192 - 161,276,254
3	1q32.1	<i>KISS1</i>	58 nt	204,161,909 - 204,161,966
4	1q32.2	<i>IRF6</i>	67 nt	209,975,466 - 209,975,532
5	1q43	<i>SDCCAG8</i>	69 nt	243,542,095 - 243,542,163

Tato změna byla shodně zaznamenána u 21 vzorků, naopak její přítomnost nebyla potvrzena u 48 vzorků. Celkem se metody shodovaly v 69 případech (93,2 %). Ve zbylých 5 případech (6,8 %) se nálezy metod neshodovaly, u všech byla změna potvrzena pouze metodou SNP array.

Tab. 13: Počty vzorků, ve kterých byl nebo nebyl zaznamenán zisk 1q jednotlivými metodami

MLPA	SNP array	
	ano	ne
ano	21	0
ne	5	48

U dvou z těchto vzorků byly nalezeny kratší změny, u prvního zisk o délce 226,904 bpv regionu 1q21.2 (chr1:149,039,120-149,266,023), u druhého zisk o délce 314,372 bp v oblasti 1q25.1 (chr1:175,442,871-175,757,242). Oba tyto zisky se nacházely v oblastech, které MLPA není schopna zachytit, první mezi 1. a 2. prábou, druhá mezi 2. a 3. prábou.

U třetího vzorku byl přítomen zisk o délce 37,685,030 bp v oblasti 1q21.1-q25.3 (chr1:145,294,531-182,979,560), který by měl být zachycen pomocí 1. a 2. MLPA próby.

U posledních dvou vzorků byla nalezena stejná změna v oblasti 1q21.1-q44 o délce 105,194,914 bp (chr1:144,007,842-249,202,755), kterou by měla být MLPA schopna najít pomocí všech 5 prób. Přesně tato změna byla nalezena i u dalších 5 vzorků, kde však byl zisk 1q potvrzen metodou MLPA.

Zisk genu *MYCN* v regionu 2p24.3

Do oblasti genu *MYCN*, který se nachází v regionu 2p24.3 (konkrétně chr2:16,080,683-16,087,129) nasedají 3 MLPA próby, první v oblasti exonu 2 a další dvě v oblasti exonu 3.

Tab. 14: Sondy navržené do oblasti genu *MYCN*

Próba	Region	Gen	Délka próby	Přesná oblast na chromozomu (v bp)
1	2p24.3	<i>MYCN</i> (exon 2)	62 nt	16,082,318 - 16,082,379
2	2p24.3	<i>MYCN</i> (exon 3)	64 nt	16,085,687 - 16,085,750
3	2p24.3	<i>MYCN</i> (exon 3)	71 nt	16,085,835 - 16,085,905

Shoda ve výsledcích obou metod (MLPA a SNP array) byla celkem u 69 vzorků (93,2 %). Z toho ve 3 vzorcích byla změna oběma metodami potvrzena a u 66 vzorků potvrzena nebyla. U 5 (6,8 %) zbývajících vzorků se nálezy neshodovaly. U tří vzorků byla potvrzena pouze metodou SNP array a ve dvou vzorcích pouze metodou MLPA.

Tab. 15: Počty vzorků, ve kterých byl nebo nebyl zaznamenán zisk v genu *MYCN* jednotlivými metodami

MLPA	SNP array	
	ano	ne
ano	3	2
ne	3	66

Změny ve všech třech vzorcích zachycené pouze metodou SNP array by měly být nalezeny všemi třemi sondami MLPA, jelikož zahrnují celý gen *MYCN*.

V prvním z těchto vzorků byl pomocí metody SNP array zachycen zisk o délce 50,392,300 bp v oblasti 2p25.3-p16.3 (chr2:72,184-50,464,483). Ve druhém vzorku byl přítomen zisk o délce 1,333,212 bp v regionu 2p24.3-p24.2 (chr2:15,616,215-16,949,426). Ve třetím vzorku byla pomocí SNP array nalezena dlouhá změna v oblasti 2p25.3-q37.3 (chr2:72,184-243,029,573). Tato stejná změna byla shodně zaznamenána u jednoho dalšího vzorku pomocí obou metod.

Ve dvou případech byl zisk v oblasti genu *MYCN* nalezen pouze metodou MLPA. U jednoho vzorku byl zachycen pomocí 1. a 2. sondy, u druhého 3. sondou.

Delece genu *WT1* v oblasti 11p13

Pro gen *WT1* jsou součástí MLPA kitu 3 próby. Jedna nasedá do oblasti exonu 11, druhá exonu 9 a třetí exonu 5. Přesná lokace genu *WT1* je chr11:32,409,322-32,457,081.

Tab. 16: Sondy situované do oblasti genu *WT1*

Próba	Region	Gen	Délka próby	Přesná oblast na chromozomu (v bp)
1	11p13	<i>WT1</i> (exon 11)	67 nt	32,410,037 - 32,410,103
2	11p13	<i>WT1</i> (exon 9)	67 nt	32,414,241 - 32,414,307
3	11p13	<i>WT1</i> (exon 5)	79 nt	32,439,123 - 32,439,201

Delece genu *WT1* byla shodně zaznamenána oběma metodami v 8 vzorcích. Naopak shodně zaznamenána nebyla v 65 vzorcích. Celkově tedy shoda u obou nastala u 73 (97,3 %) vzorků. U zbylého vzorku (2,7 %) byla delece zachycena pouze jednou z metod, a to pouze metodou MLPA.

Tab. 17: Počty vzorků, ve kterých byla nebo nebyla zaznamenána delece genu *WT1* jednotlivými metodami

MLPA	SNP array	
	ano	ne
ano	8	1
ne	0	65

Ve vzorku, ve kterém se výsledky lišily, byla změna zachycena všemi třemi MLPA sondami, zatímco SNP array ji nezaznamenal.

Delece 16q

Pro detekci změn na dlouhém raménku 16. chromozomu slouží 6 prób, které se váží do různých oblastí: 16q12.1 (gen *SALL1*), 16q13 (gen *SLC12A3*), 16q21 (gen *TK2*), 16q22.1 (gen *CDH1*), 16q23.3 (gen *MLYCD*) a 16q24.3 (gen *FANCA*).

Tab. 18: Sondy situované do oblasti 16q

Próba	Region	Gen	Délka próby	Přesná oblast na chromozomu (v bp)
1	16q12.1	<i>SALL1</i>	73 nt	51,175,285 - 51,175,357
2	16q13	<i>SLC12A3</i>	64 nt	56,912,018 - 56,912,081
3	16q21	<i>TK2</i>	69 nt	66,570,856 - 66,570,924
4	16q22.1	<i>CDH1</i>	71 nt	68,862,077 - 68,862,147
5	16q23.3	<i>MLYCD</i>	64 nt	83,941,825 - 83,941,888
6	16q24.3	<i>FANCA</i>	67 nt	89,804,412 - 89,804,478

Výsledky obou metod se shodovaly celkem u 70 vzorků (94,6 %). Z toho byl pozitivní nález u 13 vzorků a negativní u 57 vzorků. Ve zbylých 4 případech (5,4 %) se výsledky neshodovaly a delece 16q byla zaznamenána pouze metodou SNP array.

Tab. 19: Počty vzorků, ve kterých byla nebo nebyla zaznamenána delece 16q jednotlivými metodami

MLPA	SNP array	
	ano	ne
ano	13	0
ne	4	57

V jednom vzorku byla pomocí SNP array zachycena delece o délce 90,043,477 bp v oblasti 16p13.3-q24.3 (chr16:105,320-90,148,796). Tuto změnu by měla být MLPA

schopna zachytit všemi šesti sondami. Shodná delece byla přítomna v dalších dvou vzorcích, kde ji MLPA zaznamenala.

V ostatních třech vzorcích byla přítomna stejná změna, a to v oblasti 16q11.2-q24.3 o délce 43,425,199 (chr16:46,723,598-90,148,796). Tato delece by také měla být nalezena pomocí všech šesti MLPA sond. Stejná delece ve stejné oblasti byla shodně potvrzena oběma metodami u dalších tří vzorků.

Delece genu *TP53* v oblasti 17p13.1

Do oblasti na krátkém raménku 13. chromozomu, konkrétně do místa výskytu genu *TP53* (chr17:7,571,720-7,590,868), jsou situovány tři próby. Jedna nasedá na místo exonu 10, druhá do exonu 8 a třetí do exonu 7.

Tab. 20: Sondy vázající se do oblasti genu *TP53*

Próba	Region	Gen	Délka próby	Přesná oblast na chromozomu (v bp)
1	17p13.1	<i>TP53</i> (exon 10)	70 nt	7,573,952- 7,574,021
2	17p13.1	<i>TP53</i> (exon 8)	66 nt	7,577,059 - 7,577,124
3	17p13.1	<i>TP53</i> (exon 7)	79 nt	7,579,341 - 7,579,419

Delece zahrnující gen *TP53* byla zaznamenána oběma metodami v 11 vzorcích, naopak nebyla ani jednou metodou potvrzena v 62 vzorcích. Celkem se tedy výsledek obou metod shodoval v 73 případech (98,6 %). Rozdílný výsledek byl přítomen pouze u 1 vzorku (1,4 %), ve kterém byla delece *TP53* zaznamenána pouze metodou SNP array.

Tab. 21: Počty vzorků, ve kterých byla nebo nebyla zaznamenána delece genu *TP53* jednotlivými metodami

MLPA	SNP array	
	ano	ne
ano	11	0
ne	1	62

V jediném vzorku, ve kterém se metody neshodovaly, byla nalezena delece o délce 40,574,388 bp v regionu 17p13.3-q21.1 (chr17:18,901-40,593,288). Jelikož tato delece zahrnuje celý gen *TP53*, měla by ji být MLPA schopna zachytit všemi třemi sondami.

Delece genu *WTX* v oblasti Xq11.2

Pro zachycení změn v genu *WTX* (*AMER1*) obsahuje MLPA kit tři próby. Dvě nasedají do oblasti exonu 2 a třetí exonu 1. Přesná lokalizace genu *WTX* je chrX:63,404,997-63,425,624.

Tab. 22: Sondy vázající se do oblasti genu *WTX*

Próba	Region	Gen	Délka próby	Přesná oblast na chromozomu (v bp)
1	Xq11.2	<i>WTX</i> (exon 2)	73 nt	63,410,117 - 63,410,189
2	Xq11.2	<i>WTX</i> (exon 2)	61 nt	63,412,853 - 63,412,913
3	Xq11.2	<i>WTX</i> (exon 1)	63 nt	63,425,422 - 63,425,484

V detekci této změny se obě metody shodovaly v 72 (97,3 %) případech. Z toho v 70 vzorcích delece zaznamenána nebyla a ve 2 (2,7 %) byla přítomna. U 2 vzorků se nálezy neshodovaly, v jednom případě změnu zachytil pouze SNP array a ve druhém pouze MLPA.

Tab. 23: Počty vzorků, ve kterých byla nebo nebyla zaznamenána delece genu *WTX* jednotlivými metodami

MLPA	SNP array	
	ano	ne
ano	2	1
ne	1	70

V prvním vzorku byla nalezena pomocí SNP array změna v oblasti Xp22.33-q28 dlouhá 155,175,020 bp (chrX:60,814-155,235,833). Změna zahrnuje celý gen *WTX*, proto by ji měla MLPA zachytit všemi třemi sondami. Stejná změna byla přítomna u dalších dvou vzorků, ve kterých byla její přítomnost potvrzena oběma metodami.

Ve druhém vzorku deleci zachytila pouze MLPA, a to všemi třemi próbami.

Celkové shrnutí

Shodu metod jsme sledovali u 74 vzorků na 7 různých změnách (delece 1p, zisk 1q, zisk 2p24.3 (*MYCN*), delece 11p13 (*WT1*), delece 16q, delece 17p13.1 (*TP53*) a delece Xq11.2 (*WTX*)). Celkem jsme tedy měli 518 případů, ve kterých mohla shoda obou metod v nálezů dané změny nastat. Z toho se výsledky obou metod shodovaly ve 496 případech (95,8 %) a lišily se ve zbývajících 22 (4,2 %).

Pokud se zaměříme na případy, ve kterých se nálezy metod lišily, tak ve většině případů byla změna zachycena pouze pomocí SNP array (18 případů (81,8 %)) a ve zbytku pomocí MLPA (4 případy (18,2 %)).

Tab. 24: Počty případů podle toho, kterými metodami byla změněna zachycena

MLPA	SNP array	
	ano	ne
ano	67	4
ne	18	429

Abychom ověřili, zda jsou metody ve výsledcích shodné, použili jsme McNemarův test (test hypotézy o symetrii). Nulovou hypotézou bylo, že jedna metoda je při zachytu změny stejně úspěšná jako druhá metoda. Výsledná p – hodnota byla $p = 0,0028$, čímž jsme zamítli nulovou hypotézu na 5% hladině významnosti.

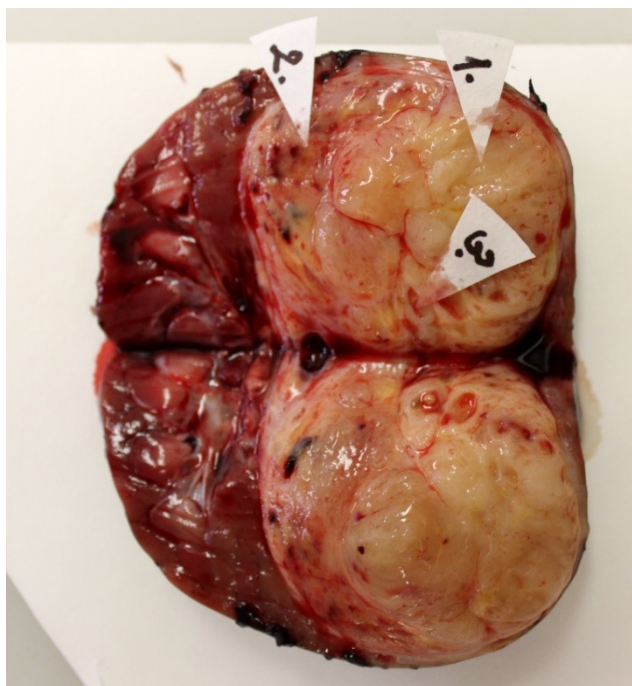
Ze všech 74 vzorků nastala shoda v zachytu všech sledovaných změn u 58 (78,4 %). Ve zbylých 16 vzorcích (21,6 %) došlo k rozdílným výsledkům alespoň u jedné změny. Tyto výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 30 v příloze.

4.3. Intratumorová heterogenita chromozomálních změn

Pro účely vyhodnocení intratumorové heterogenity v přítomných chromozomálních změnách jsme využili celkem 42 vzorků pocházejících od 14 pacientů.

4.3.1. Postup při zpracování výsledků

Od každého pacienta byly odebrány 3 vzorky (každý z jiného místa nefroblastomu).

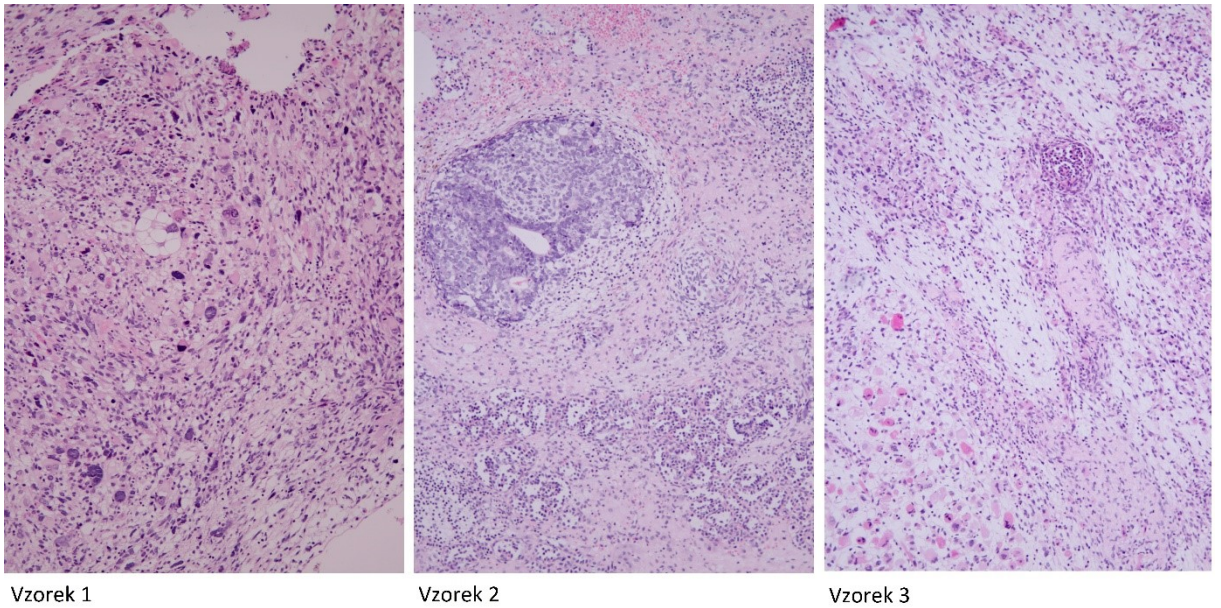


Obr. 13: Znázornění míst, ze kterých byly odebrány vzorky z tumoru pacientky č. 14

Na obrázku jsou papírky s čísly naznačena 3 místa, ze kterých byla odebrána tkáň nefroblastomu. Paralelně je ze stejného místa zamražena tkáň i odebrán vzorek k histologickému vyšetření.

Celý resekát tumoru s případným zbytkem zdravé ledviny byl dodán do Ústavu patologie molekulární medicíny FNM, kde byl materiál zpracován. Resekát byl zvážen a byla provedena makrodokumentace, dále byl resekát rozkrojen a byla vybrána místa pro studii heterogenity tumoru. Z těchto míst (viz obrázek výše) byla odebrána tkáň k histologickému vyšetření a paralelní část byla zamražena přes tekutý dusík a umístěna do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorek tkáně určený k histologickému vyšetření byl ověřen prim. MUDr. Danielou Kodetovou a MUDr. Markem Gregou. Na KDHO byla izolována DNA ze zmrazené tkáně a analyzovali jsme přítomné chromozomální změny metodami MLPA a SNP array. Výsledky ze všech těchto vyšetření jsme uspořádali do přehledného obrázku, abychom mohli mezi sebou snáze porovnávat pacientovy vzorky (obr. č. 17).

Jako příklad uvádíme pacientku č. 14. Nejprve jsme získali výsledky histologického vyšetření a mikroskopické snímky ze všech 3 vzorků.

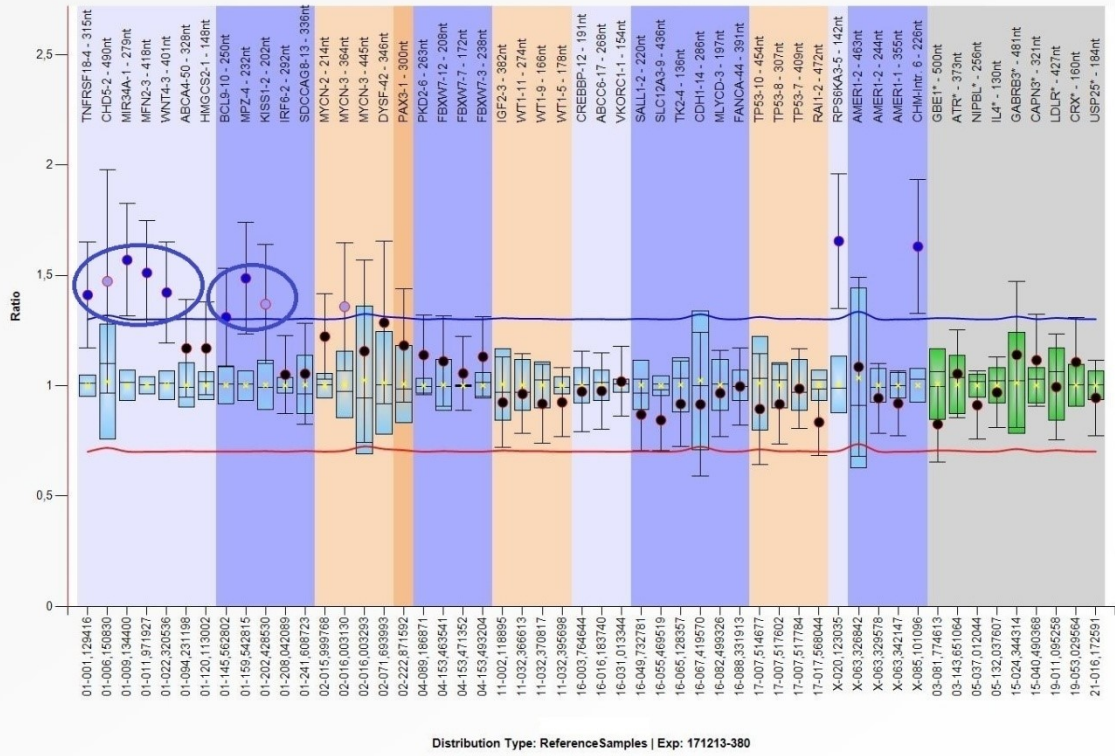


Obr. 14: Histologické snímky ze všech vzorků pacientky (zvětšení 5000x)

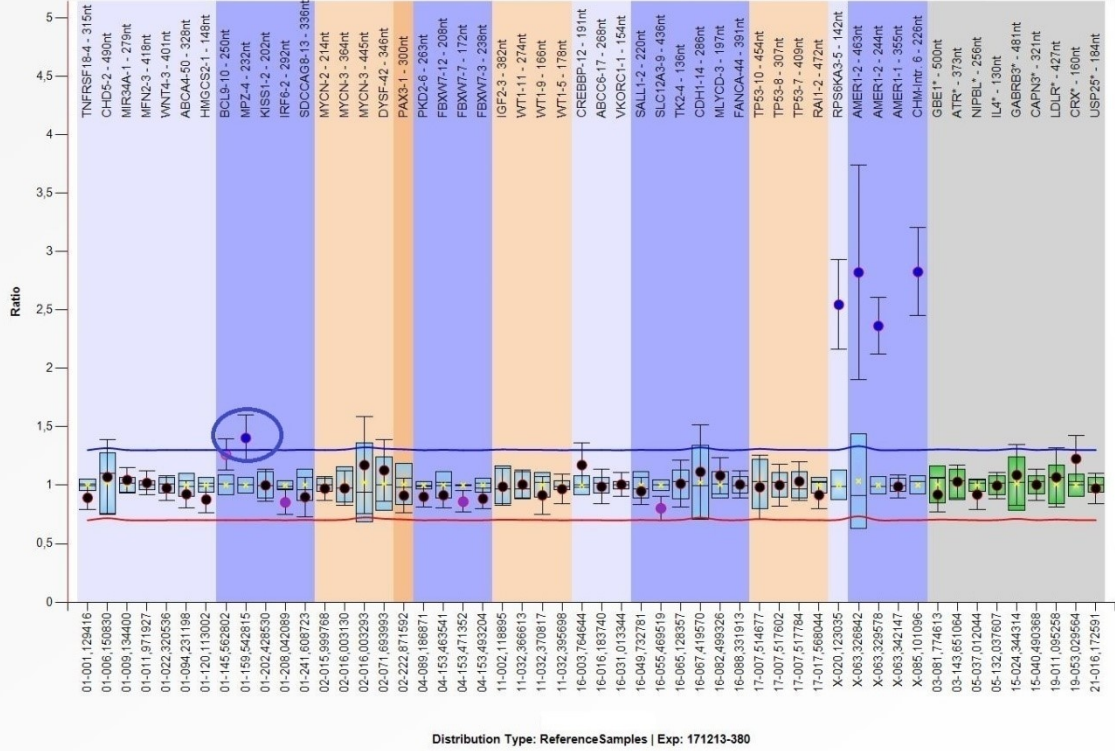
Vzorek 1 - anaplastický nefroblastom s rhabdomyoblastickou diferenciací; vzorek 2 - trifázický nefroblastom; vzorek 3- trifázický nefroblastom s rhabdomyoblastickou diferenciací

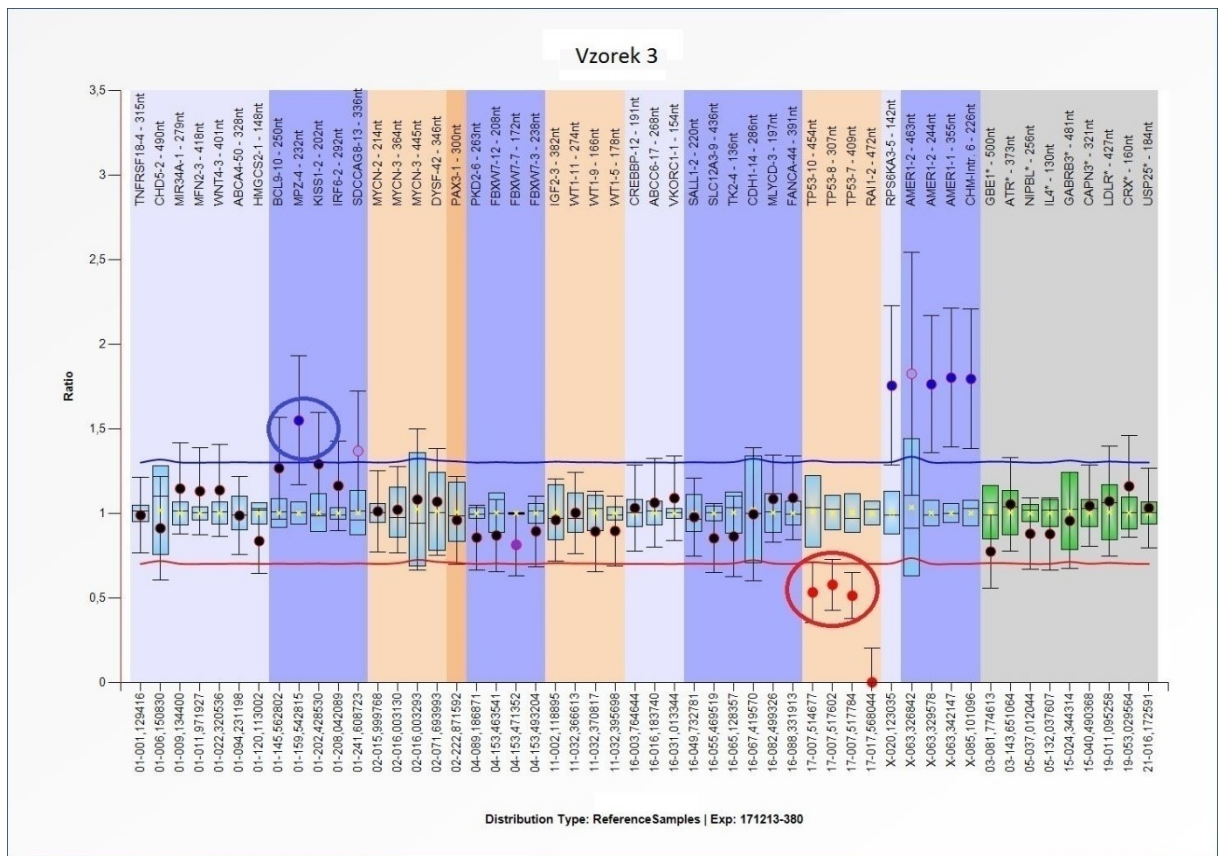
Poté jsme ke všem vzorkům přidali výsledky MLPA, které jsme vyhodnotili v programu Coffalyzer.net (MRC Holland) (viz obr. 15).

Vzorek 1



Vzorek 2



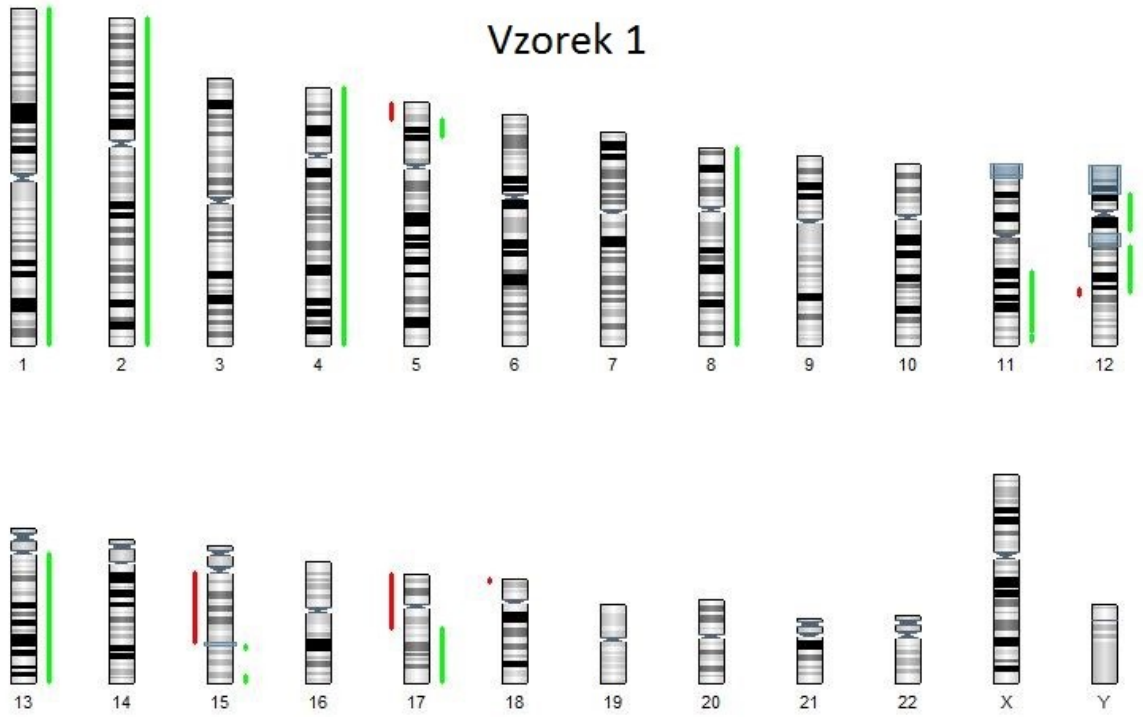


Obr. 15: Výsledky MLPA všech tří vzorků

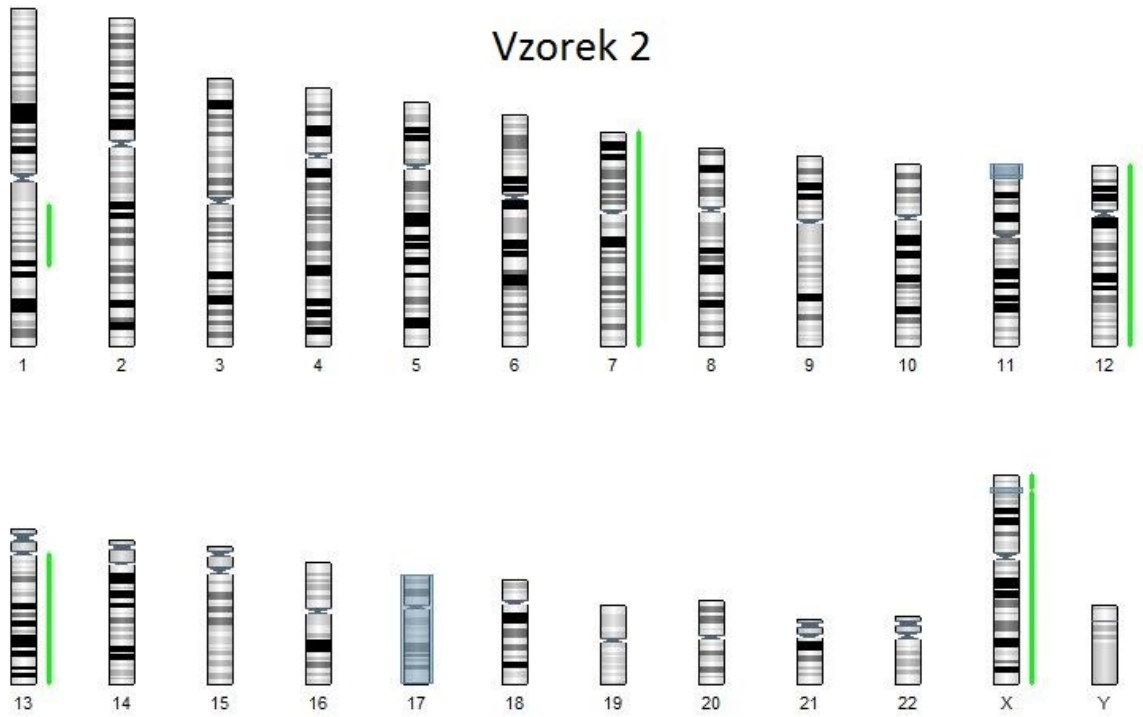
Vzorek 1 - modře je zakroužkovaný zisk 1p a 1q; vzorek 2 - modře znázorněn zisk 1q; vzorek 3 - modře je označen zisk 1q, červeně delece 17p (gen TP53)

Nakonec jsme obrázek doplnili o grafické znázornění chromozomálních změn zachycených metodou SNP array, které jsme získali v programu BlueFuse Multi (Illumina) (viz obr. 16).

Vzorek 1



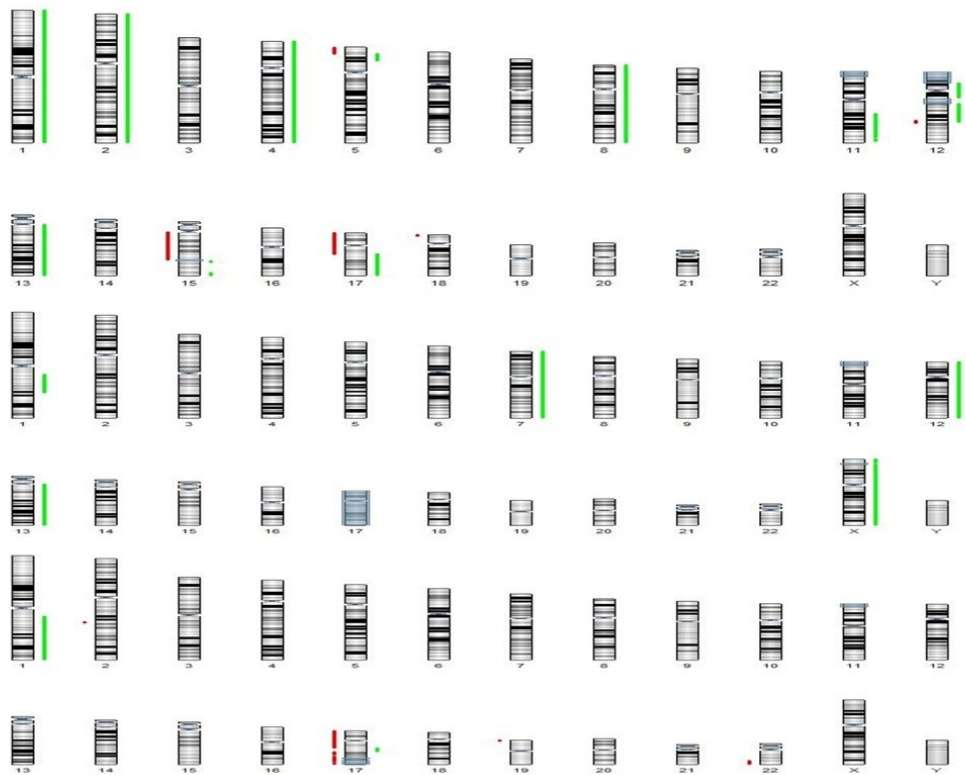
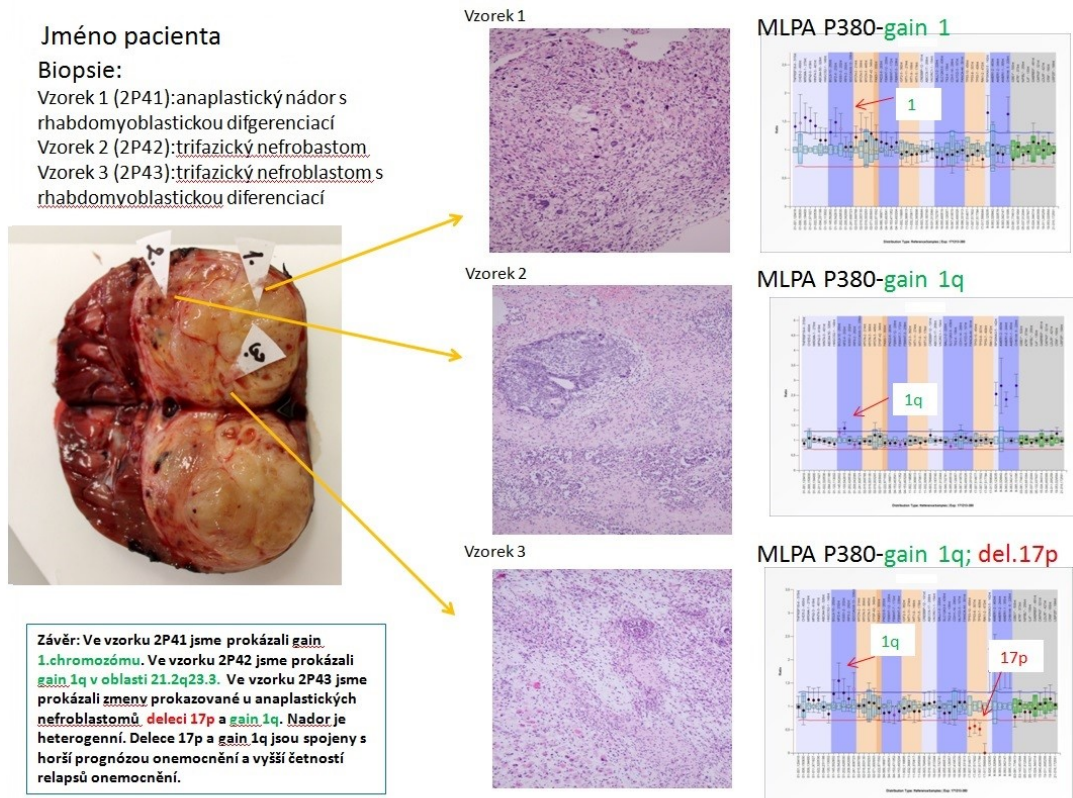
Vzorek 2





Obr. 16: Výsledky SNP array všech tří vzorků

Barevné čáry znázorňují úseky chromozomů, ve kterých byla zachycena změna (zeleně jsou zisky, červeně delece). Modré ohraničení chromozomu ukazuje úsek s LOH.



Obr. 17: Výsledný obrázek

Na obrázku jsou seskládány výsledky z histologického vyšetření, výsledky MLPA a SNP array všech 3 vzorků

4.3.2. Vyhodnocení

Nejprve jsme hodnotili každého pacienta zvlášť. Všechny změny zaznamenané metodou SNP array ve vzorcích všech pacientů jsou znázorněny na obrázku č. 19.

U pacienta č. 1 byly nalezeny netypické změny na 2., 6., 7., 8. a X chromozomu. Všechny tyto změny byly homogenní, což znamená, že ve všech třech vzorcích tohoto pacienta byly shodné.

V tumoru pacienta č. 2 jsme identifikovali pomocí SNP array pouze změny na 7. (delece 7p a zisk 7q) a 11. (LOH) chromozomu. Tyto změny byly homogenní. Pomocí MLPA byla zaznamenána delece 11p zahrnující gen *WT1* v jednom ze tří vzorků.

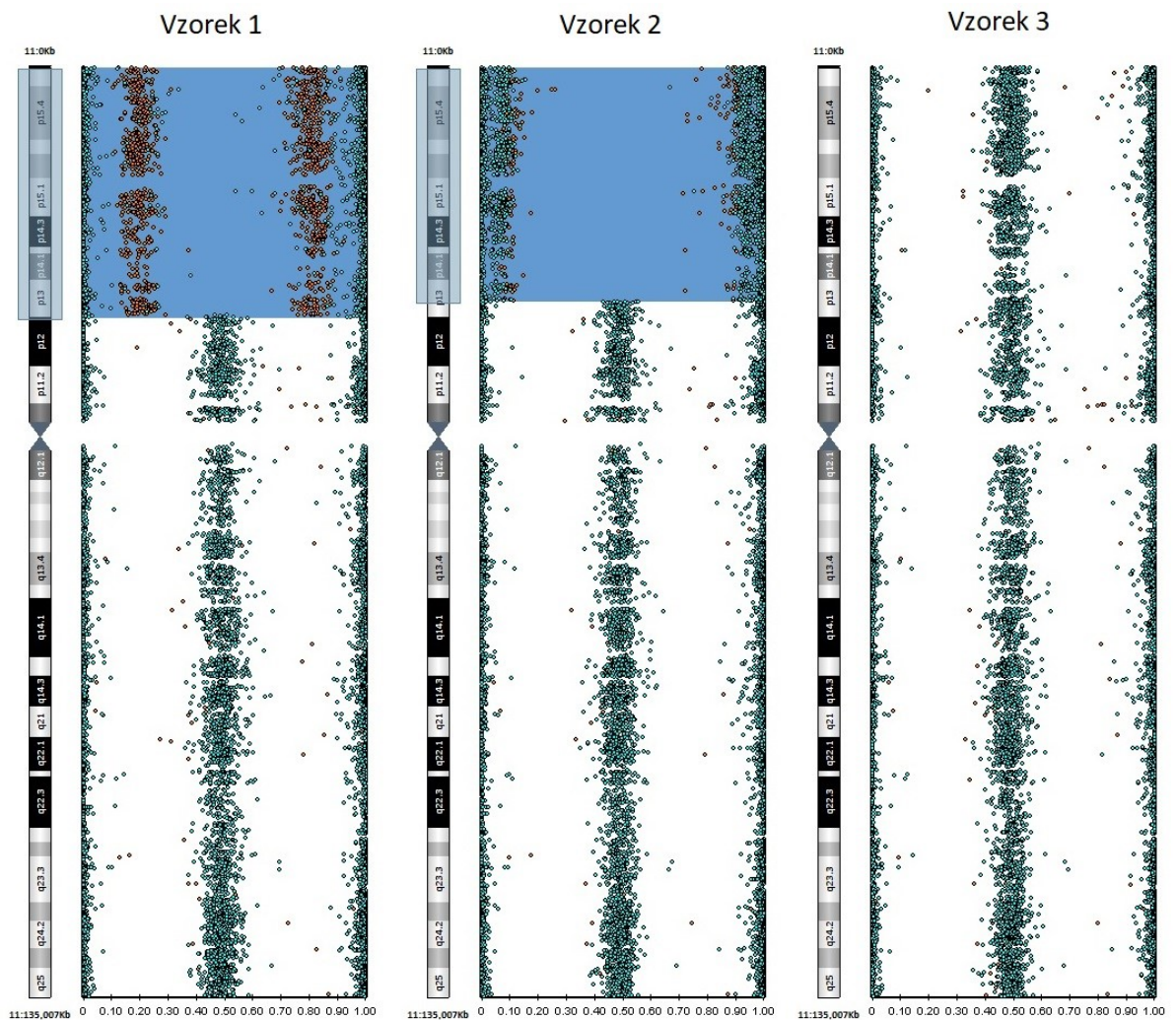
U třetího pacienta jsme našli velké množství změn (delece a zisky), a to na 1., 3., 4., 6., 9., 10., 12., 13., 15., 16., 17., 18. a 21. chromozomu. Mezi nimi byl i zisk 1q, který byl potvrzen i metodou MLPA ve všech třech vzorcích. Ze všech těchto změn byly heterogenní delece 4q (nalezena v jednom vzorku) a zisk na 9. chromozomu (nalezen ve dvou vzorcích). Ostatní změny byly homogenní.

U pacienta č. 4 byly přítomny změny na 1. chromozomu (delece 1p a zisk 1q), 4., 7., 8., 10., 13., 18. a X chromozomu zaznamenané metodou SNP array. Z nich byly heterogenní delece 4. chromozomu (ve 2 vzorcích), zisk 7q (2 vzorky), zisk 10p a delece 10q (1 vzorek), delece 18. chromozomu (1 vzorek) a zisk Xq (2 vzorky). Dále jsme pomocí MLPA zaznamenali vždy v jednom vzorku zisk *MYCN*, zisk 11p a zisk 17p.

U dalšího pacienta jsme našli pouze heterogenní změny nacházející se na 1. (delece 1p v 1 vzorku, delece 1q v 1 vzorku, zisk 1q ve 2 vzorcích), 6. (delece v 1 vzorku), 7. (zisk v 1 vzorku), 8. (zisk v 1 vzorku), 9. (delece i zisk v 1 vzorku), 10. (zisk v 1 vzorku), 11. (LOH ve všech vzorcích, ale o různé délce), 12. (zisk v 1 vzorku), 13. (zisk v 1 vzorku), 17. (delece i zisk ve všech vzorcích, ale různé délky), 19. (delece i zisk v 1 vzorku) a X (zisk ve 2 vzorcích) chromozomu. Přítomnost zisku 1q (ve dvou vzorcích) a delece 17p byla potvrzena i metodou MLPA.

U pacienta č. 6 jsme zaznamenali homogenní (zisk 1q, delece 6q a 7q, delece 16q) i heterogenní (zisk 8. a 9. chromozomu v 1 vzorku, LOH 11p ve 2 vzorcích, zisk

12. chromozomu v 1 vzorku a delece 17q v 1 vzorku) změny. Metodou MLPA jsme potvrdili přítomnost zisku 1q a delece 16q u dvou vzorků.



Obr. 18: Bližší pohled na 11. chromozom pacienta č. 6 ve všech vzorcích

Na obrázku je zobrazen 11. chromozom pomocí programu BluFuse Multi ze všech tří vzorků z nefroblastomu pacienta. Dolní osa udává frekvenci alely B a na levém okraji jsou znázorněny regiony chromozomu. V prvních dvou vzorcích je v modrém viditelná LOH, zatímco ve třetím vzorku není.

U pacienta č. 7 jsme našli pouze dvě změny, a to deleci 6q (ve všech vzorcích) a deleci 16p (v 1 vzorku).

V nádoru pacienta č. 8 jsme zaznamenali pouze dvě změny přítomné ve všech vzorcích (tedy homogenní), a to zisk 15q a LOH 19q.

U pacienta č. 9 jsme zachytili v jednom vzorku delecí 7p a zisk 7q, ve dvou vzorcích LOH 11p a ve dvou vzorcích zisk 22q. Všechny nalezené změny tedy byly heterogenní.

Všechny změny v tumoru desátého pacienta byly heterogenní a všechny jsme zaznamenali pouze v jednom vzorku. Nalezli jsme delecí 1p, delecí 6q, zisk 8q, delecí 14q, delecí 15p, delecí 17q a zisk a delecí na 22. chromozomu.

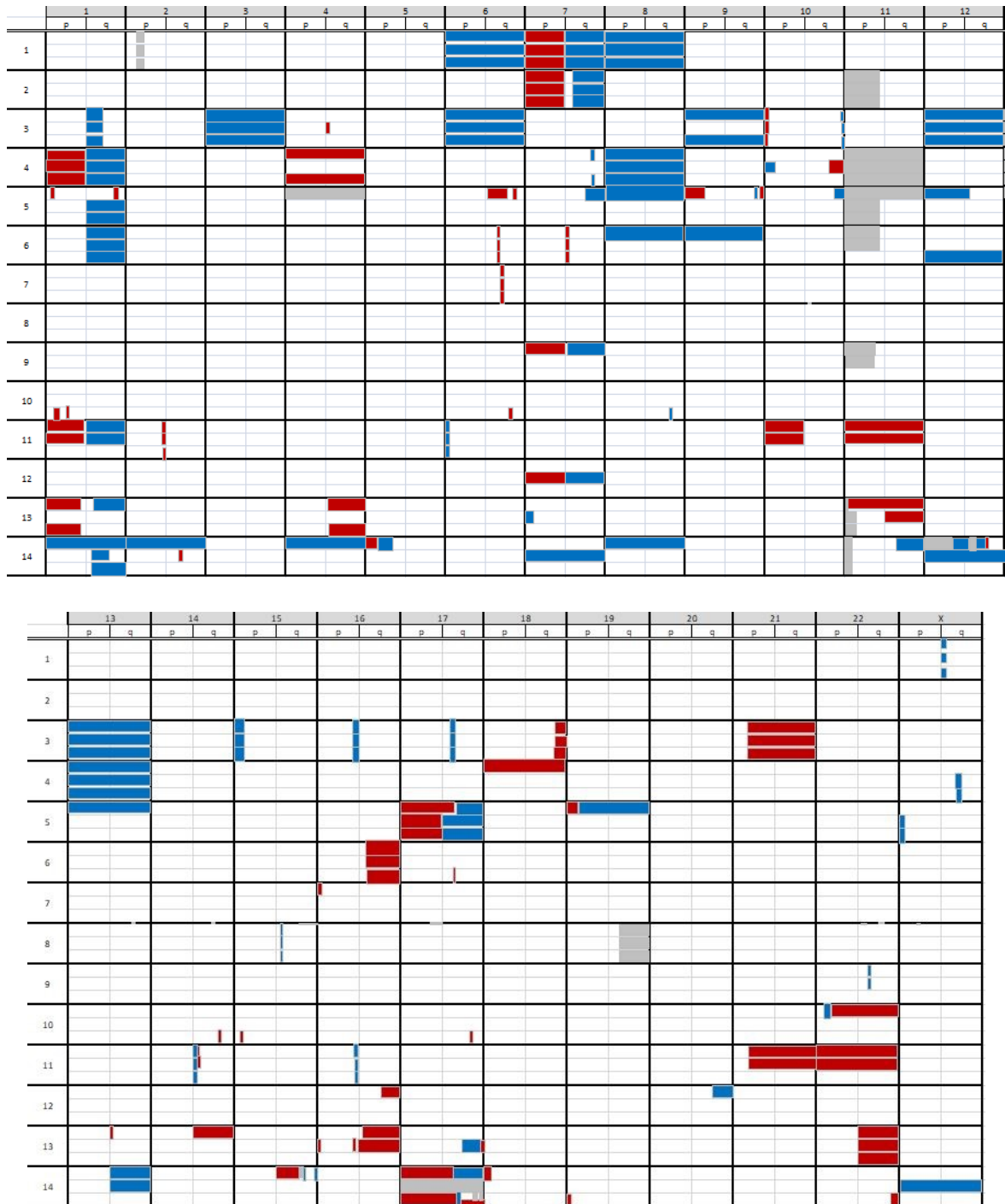
V nefroblastomu pacienta č. 11 jsme našli změny na 1., 2., 6., 10., 11., 14., 16., 21. a 22. chromozomu. Z nich byly heterogenní delecí 1p a zisk 1q (ve 2 vzorcích), delecí 10. a 11. chromozomu (ve 2 vzorcích), delecí 14q (ve 2 vzorcích), delecí na 21. chromozomu (ve 2 vzorcích) a delecí 22. chromozomu (2 vzorky).

U dvanáctého pacienta jsme zaznamenali změny pouze na třech chromozomech, a to delecí 7p, zisk 7q, delecí 16q a zisk 20q. Všechny tyto změny byly v tumoru heterogenní a vyskytovaly se všechny jen v jednom vzorku.

U pacienta č. 13 jsme bylo přítomno větší množství změn, na 1., 4., 7., 11., 13., 14., 16., 17. a 22. chromozomu. Pouze delecí 22q byla homogenní změna, ostatní se vyskytovaly pouze v některých vzorcích nefroblastomu. Ve dvou vzorcích jsme zaznamenali delecí 1p, delecí 4q, delecí 11. chromozomu a delecí 16q, v jednom vzorku jsme našli zisk 1q, zisk 7p, delecí 13q, delecí 14q, delecí 16p a delecí a zisk 17q. Dále jsme zachytili LOH 11p ve všech třech vzorcích, ale různé délky. Delecí 1p a delecí 4q ve dvou vzorcích a delecí 16q a delecí 11p v jednom vzorku jsme potvrdili i metodou MLPA. Dále jsme pomocí MLPA našli v jednom vzorku delecí genu *WTX*.

V tumoru posledního pacienta byly přítomny změny na 1., 2., 4., 5., 7., 8., 11., 12., 13., 15., 17., 18., 19., 22. a X chromozomu. Jedinou homogenní změnou byla LOH 11p. Ostatní změny byly zachyceny jen v některých vzorcích a byly heterogenní, a to zisk 1p (1 vzorek), zisk 1q (všechny vzorky, ale různá délka), zisk 2. chromozomu (1 vzorek), delecí 2q (1 vzorek), zisk 4. chromozomu (1 vzorek), delecí i zisk 5p (1 vzorek), zisk 7. chromozomu (1 vzorek), zisk 8. chromozomu (1 vzorek), zisk 11q (1 vzorek), LOH 12p a 12q (1 vzorek), delecí 12q (1 vzorek), zisk 12p a 12q (2 vzorky), zisk 13q (2 vzorky), delecí, LOH i zisk 15q (1 vzorek), delecí 17p a 17q (2 vzorky), zisk 17q (2 vzorky), LOH 17p (1 vzorek), LOH 17q (2 vzorky), delecí 18p (1 vzorek), delecí 19p (1 vzorek), delecí 22q

(1 vzorek) a zisk X chromozomu (1 vzorek). Zisk 1p, zisk 1q a delece 17p byly potvrzeny i metodou MLPA. U tohoto pacienta jsme zaznamenali deleci 17p včetně genu *TP53* ve vzorku pocházejícího z trifázické oblasti nefroblastomu (viz obr. č. 17).



Obr. 19: Změny zaznamenané metodou SNP u všech 14 pacientů

Po levé straně jsou uvedena čísla pacienta, kdy ke každému pacientovi jsou přiřazeny tři řádky představující tři vzorky. V horní liště jsou čísla chromozomů rozdělena na krátká (p)

a dlouhá raménka (q). Modré plochy značí zisky, červené delece a šedé LOH. (Při vytváření této tabulky jsme se inspirovali Cresswell et al. 2016)

Celkově ze všech 14 pacientů měli pouze 2 homogenní nálezy chromozomálních změn ve 3 vzorcích nefroblastomu. U ostatních 12 tumorů jsme zaznamenali heterogenitu v alespoň jedné chromozomální změně. U 4 pacientů byly heterogenní všechny přítomné chromozomální změny.

Deleci 1p jsme zaznamenali u 5 pacientů a u 4 z nich to byla v heterogenním stavu. Ve dvou případech se vyskytovala ve dvou vzorcích a ve dvou případech pouze v jednom vzorku. Zisk 1q byl přítomen v tumoru 7 pacientů, z toho u 4 v heterogenním stavu. U 2 pacientů jsme ho našli ve dvou vzorcích, u jednoho v jednom vzorku a u jednoho ve všech vzorcích, ale o různé délce. Zisk genu *MYCN* se vyskytoval pouze heterogenně, a to u 2 pacientů, v obou případech pouze v jednom vzorku. Delece genu *WT1* byla také v heterogenním stavu, zaznamenali jsme ji u 2 pacientů, u prvního v jednom vzorku, u druhého ve dvou. Deleci 16q jsme zachytili ve 3 nefroblastomech, z toho ve dvou v heterogenním stavu (v jednom případě ve dvou vzorcích, ve druhém v jednom vzorku). Delece 17p zahrnující gen *TP53* byla přítomna u 2 pacientů. V jednom případě jen ve dvou vzorcích, ve druhém ve všech, ale o různé délce. Deleci genu *WTX* jsme zaznamenali jen u 1 pacienta, a to v jednom vzorku (byla tedy v heterogenním stavu). LOH 11p jsme našli u 7 pacientů, z toho u 4 se vyskytovala v heterogenním stavu. U dvou pacientů jsme ji zachytili jen ve dvou vzorcích a u dvou pacientů ve všech vzorcích, ale s různou délkou.

Velké množství přítomných chromozomálních změn bylo v heterogenním stavu. Jako homogenní se v tumorech našich pacientů vyskytovaly pouze LOH 2p, trizomie 3. chromozomu, zisk 6p a trizomie 6. chromozomu, delece 7q, zisk 14q, zisk 15p, zisk 16p a LOH 19q.

6. Diskuze

V této práci jsme si stanovili několik cílů. Prvním z nich bylo vyšetřit vzorky metodami SNP array a MLPA a analyzovat chromozomální změny u našich pacientů a poté zjistit, zda tyto změny souvisí s některými z klinických dat pacientů (konkrétně věkem v době diagnózy, pohlavím, histologickým typem nefroblastomu a stádiem onemocnění).

Celkově jsme prokázali chromozomální změny na všech chromozomech s různou četností.

Mnoho chromozomálních změn typických pro nefroblastom jsme zaznamenali s vyšší frekvencí v porovnání s jinými zahraničními studii. Například delecí 1p jsme zachytili u 20,45 % pacientů, zatímco Grundy et al. (1994) u 12 %, Bown et al. (2002) u 8,7 % a Grundy et al. (2005) u 11,3 %. Delecí 16q jsme zachytili u 25 % pacientů, zatímco Grundy et al. (1994) u 17 % a Grundy et al. (2005) u 17,8 % pacientů. Dále jsme u 18,2 % pacientů prokázali zisk 2p zahrnující gen *MYCN*. Ve studii Williams et al. (2010) byla tato změna přítomna u 8,7 %, Williams et al. (2011) u 9,5 % a Williams et al. (2015) u 12,6 % pacientů. Delecí 11p včetně genu *WT1* jsme našli u 15,9 % pacientů, zatímco Reddy a Licht (1996) udávají průměrnou hodnotu získanou z jiných studií 9,6 %. Zisk 1q, který byl nejčastější změnou, jsme našli u 31,8 % pacientů, zatímco Bown et al. (2002) u 18 %, Gratias et al. (2013) u 27 %, Gratias et al. (2016) a Chagtai et al. (2016) u 28 %.

Avšak ve studii Natrajan et al. (2006) byly frekvence některých změn podobnější těm našim. Delecí 1p zaznamenali u 18 % pacientů, delecí 16q ve 24 % a výskyt zisku 1q našli dokonce vyšší než my, a to u 40 % tumorů. Může to být způsobeno tím, že v této studii vyšetřovali nefroblastomy od nižšího počtu pacientů (76), zatímco v ostatních studiích bylo pacientů většinou alespoň 200. Dále také v ostatních studiích mohli mít jiné podíly pacientů s jednotlivými histologickými typy nefroblastomu, například nižší počet anaplastických nefroblastomů, se kterými je spojen výskyt některých chromozomálních změn (zisk *MYCN*, delecce *TP53*, ale i gan 1q). Příkladem je studie Gratias et al. (2016), do které nezahrnuli anaplastické nefroblastomy vůbec.

Ve frekvencích výskytu delece Xq zahrnující gen WTX je větší variabilita. My jsme ji zaznamenali u 9,1 % pacientů, Perotti et al. (2008) tuto změnu našli v 14,7 % nefroblastomů, Wegert et al. (2009) u 17 % a Rivera et al. (2007) u 21,6 % pacientů.

Delece 1p a delece 16q jsou využívány pro stratifikaci nefroblastomů, jelikož jsou spojeny s relapsem onemocnění, především pokud jsou přítomny v tumoru pacienta obě zároveň (Grundy et al. 2005; Davidoff 2009; Spreafico et al. 2013). U 3 našich pacientů jsme zaznamenali společnou delecí 1p a 16q, ale nebyla u nich nijak významně spojena s relapsy onemocnění, jelikož k němu došlo jen u jednoho z nich. Avšak jeden z těchto pacientů se nyní léčí s primárním nádorem a tudíž je možné, že u něj v budoucnu k relapsu dojde. Abychom mohli z našich výsledků vyvodit, zda společná delece 1p a 16q souvisí se zvýšeným rizikem relapsů, potřebovali bychom více pacientů s touto společnou změnou.

Zisk 1q, který se u našich pacientů vyskytoval jako nejčastější změna, je používán ve stratifikaci nefroblastomů jako negativní prognostický marker (Gratias et al. 2013; Chagtai et al. 2016). Proto jsme porovnali data přežití (EFS – event-free survival a OS – overall survival) mezi pacienty s touto změnou a beze změny. Jak jsme předpokládali, byly obě hodnoty nižší pro skupinu se ziskem 1q. Hodnoty EFS vyšly 83,3 % (bez zisku) a 69,2 % (se ziskem) a OS 90 % (bez zisku) a 84,6 % (se ziskem). I přesto, že jsou rozdíly vysoké, nebyly statisticky signifikantní (pro EFS $p = 0,27$, pro OS $p = 0,546$), na rozdíl od studií Gratias et al. (2016), kde u osmiletého přežití bylo p (EFS) $< 0,001$ a p (OS) $< 0,001$, a Chagtai et al. (2016), kde u pětiletého přežití bylo p (EFS) $< 0,001$ a p (OS) = 0,01. Výsledky bychom mohli mít statisticky významné při vyšším počtu pacientů, jelikož v těchto studiích jich měli 1114 (Gratias et al. 2016) a 586 (Chagtai et al. 2016). Získali jsme i data přežití pro všechny pacienty (bez dělení do skupin), a to EFS = 79,1 % a OS = 88,4 %. Celkové přežití (OS) se celosvětově uvádí přes 90 % (Pritchard-Jones a Pritchard 2004). Například ve studii Gratias et al. (2016) získali EFS = 86 % a OS = 94 %. Hodnoty jsou vyšší než u našich pacientů, avšak to je dáno i tím, že do této studie zařadili pouze nefroblastomy s příznivou histologií, zatímco my všechny nefroblastomy včetně anaplastických, které jsou považovány za nefroblastomy vysokého rizika (Delemarre et al. 1996)

Zisk 1q bývá často v nefroblastomech nalezen společně s jednou z následujících změn, delece 1p nebo delece 16q, což poukazuje na možnost jeho vzniku. Buď například nebalancovanou translokací mezi 1q a 16q nebo jako izochromozom 1q nebo ring chromozom 1. (Kaneko et al. 1983; Bown et al. 2002) To jsme potvrdili i v naší kohortě pacientů. Společný výskyt zisku 1q a delece 1p byl zaznamenán u 4 pacientů, společný výskyt zisku 1q s delecí 16q u 2 pacientů a všechny tři změny jsme zachytili u 4 pacientů. Pouze u 5 pacientů se ziskem 1q nebyla přítomna žádná z těchto změn, což znamená, že musel vzniknout např. translokací s jiným chromozomem, jako ve studii Gratiyas et al. (2013).

Dále jsme zaznamenali vysoký výskyt i dalších změn, které nebývají typicky spojovány s nefroblastomem. U více než 20 % pacientů jsme našli například delecí 17q (31,8 %), zisk Xq (29,6 %), delecí 7p (25 %), nebo delecí 22q (25 %). Delecí 22q našli Bown et al. (2002) ve své studii pouze v 6,6 % nefroblastomů, i přesto, že v ní byli zahrnuti i pacienti s anaplastickým typem nefroblastomu, se kterým je delece 22q asociována. Tuto asociaci zjistili Klamt et al. (1998) a potvrdili jsme ji i my ($p = 0,007$), přičemž byla přítomna ve všech 4 nefroblastomech anaplastického typu. Dále jsme potvrdili asociaci delece 22q s vyšším věkem pacientů v době diagnózy ($p = 0,02$), stejně jako Spreafico et al. (2013). V této studii byla delece 22q statisticky významně spojena s věkem v době diagnózy vyšším než 2 roky, podobné výsledky jsme měli i my (medián pacientů s delecí 22q byl 55 měsíců a beze změny 31 měsíců).

Závislost delece 22q s vyšším věkem v době diagnózy a s anaplastickým typem nefroblastomů nebyla jedinou statisticky významnou asociací, kterou jsme zaznamenali. S vyšším věkem byla asociována i delece 7p ($p = 0,003$), u dívek se častěji vyskytovaly delece 13q ($p = 0,025$), delece 22q ($p = 0,046$) a delece Xq ($p = 0,011$) a u chlapců zisk Xq ($p = 0,009$), s anaplastickým typem byla spojena také delece 17q ($p = 0,006$). Abychom mohli ověřit platnost signifikance těchto asociací (zda nejde pouze o náhody, jelikož je zatím nikdo nepublikoval), bylo by třeba provést testy s vyšším počtem pacientů.

Co je zajímavé, nepotvrdili jsme v našem vzorku pacientů asociaci zisku genu *MYCN* a delece genu *TP53* s anaplastickým typem, jako je tomu v jiných studiích (Williams et al. 2015; Jadali et al. 2011). Avšak pro delecí *TP53* byly výsledky téměř signifikantní ($p =$

0,076) a pro zisk genu MYCN byla také p – hodnota nižší ($p = 0,147$). V některých studiích je výskyt těchto změn uváděn pouze v anaplastických nefroblastomech (Bardeesy et al. 1994), ovšem u nás se vyskytovaly i v nádorech jiného histologického typu.

Ve druhé části práce jsme porovnávali výsledky obou použitých metod (MLPA a SNP array), abychom mohli určit jejich shodu, a to v závislosti na tom, zda byly dané změny shodně zachyceny oběma metodami nebo pouze jednou z nich.

Výsledkem bylo, že metody se shodovaly v 95,8 %. Ve zbylých 4,2 % (což bylo ve 22 případech) se rozcházely a signifikantně jsme potvrdili jejich neshodu ($p = 0,0028$). Metoda SNP array se ukázala jako citlivější metoda, pomocí níž jsme zaznamenali velké množství změn (v 18 případech), které MLPA nezachytila nebo ani nebyla schopna je zachytit. V některých případech se chromozomální změny nacházely v místech, do kterých se neváže žádná z MLPA sond, ale ostatní změny by měla MLPA zaznamenat. Jedním z důvodů, proč tomu tak není, by mohlo být vysoké množství zdravých buněk ve vzorku, postrádajících danou změnu, což by vedlo k tomu, že rozdíl mezi výškami vrcholů v elektroforeogramech mezi kontrolním a vyšetřovaným vzorkem by nebyl dostatečný k tomu, aby byl vyhodnocen jako chromozomální změna.

Jen ve 4 případech byla změna zachycena pouze pomocí MLPA, zatímco SNP array ji nezaznamenal. Tady je například možné, že změny byly velmi krátké (desítky nebo stovky bp), ale zrovna v místě, kam nasedá některá z MLPA prób a MLPA je proto zaznamenala. V dané oblasti však mohlo být přítomno velmi málo SNP využívaných metodou SNP array (nebo žádné) a proto to programem nebylo vyhodnoceno jako změna.

Posledním cílem bylo prokázat intratumorovou heterogenitu v přítomných chromozomálních změnách na základě odebrání 3 vzorků tkáně z jednoho nefroblastomu a porovnání výsledků vyšetření těchto vzorků u každého pacienta. Intratumorovou heterogenitu v chromozomálních změnách jsme sledovali u 14 pacientů.

Podrobnější výzkum heterogenity je důležitý ze dvou různých důvodů, a to z klinického hlediska, ale i biologického. Z toho biologického lze díky heterogenitě chromozomálních změn v tumoru pochopit některé evoluční dráhy účastnící se vývoje nádoru a zjistit, které z těchto změn mohou být zodpovědné za počátek tumorigeneze.

Zatím nebylo zveřejněno mnoho studií věnujících se tomuto tématu. Podle Wegert et al. (2009) je delece genu *WTX* změnou, která vzniká až v pozdější fázi vývoje nefroblastomu, stejně tak delece genu *TP53* (Wegert et al. 2017) a zisk 1q (Cresswell et al. 2016). To jsme pro všechny tři změny potvrdili. Deleci genu *WTX* jsme zaznamenali u jednoho pacienta pouze v jednom vzorku. Zisk 1q byl přítomen v heterogenním stavu u 3 ze 7 pacientů s touto změnou (ve dvou případech jen ve dvou vzorcích a ve třetím v jednom vzorku).

Deleci genu *TP53* jsme našli u dvou pacientů, z toho u jednoho jako heterogenní změnu (v jednom vzorku). Stejně jako Wegert et al. (2017) jsme zaznamenali deleci genu *TP53* v jiné než anaplastické části tumoru. Změna byla přítomna ve vzorku odebraném z trifázické části a naopak ve vzorku s anaplastickými buňkami chyběla. Tady se nabízí otázka, zda není možné, že by se později během vývoje, pokud by pacient nebyl léčen, vyvinula tato část tumoru také v anaplastický. Předpokládá se, že k tomu může dojít porušením funkce tohoto genu (Al-hussain et al. 2014; Bardeesy et al. 1995). Je tedy možné, že v anaplastické části tumoru, kde jsme nezachytili deleci genu *TP53*, mohla být přítomna jiná změna, která by měla na správnou funkci genu vliv, např. balancovaná translokace.

Naopak LOH ve formě uniparentální dizomie (UPD) v oblasti 11p15 byla doposud považována za změnu vznikající na počátku vývoje tumoru a vedoucí k tumorigenezi, jelikož byla nalezena u pacientů pouze v homogenním stavu (Cresswell et al. 2016). To se zdá pravděpodobné i vzhledem k tomu, že děti s Beckwith-Wiedemannovým syndromem, který je způsoben u 20 % nemocných přítomností paternální UPD (pUPD) 11p15 jako germinální změny, jsou náchylnější ke vzniku nefroblastomu. My jsme však tuto domněnku v naší práci vyvrátili. pUPD 11p15 jsme zaznamenali jako heterogenní změnu, která byla přítomna pouze ve dvou vzorcích ze tří dokonce u dvou různých pacientů (č. 6 a č. 9).

Z naší práce vyplývá, že pUPD 11p15 se může u nefroblastomů uplatňovat i v pozdějším stádiu vývoje tumoru a nemusí být pouze drift mutací, jak se doposud myslelo. Tuto skutečnost jsme prokázali u nefroblastomu zatím jako jediní, ale vzhledem k tomu, že jsme ji prokázali u dvou pacientů a dvěma nezávislými metodami, je tento

nález jednoznačný. V další práci se zaměříme na průkaz možných drift mutací u těchto pacientů.

V homogenním stavu jsme zaznamenali pouze LOH 2p a 19q, trizomii 3. a 6. chromozomu, delecii 7q a zisky 14q, 15p a 16p. Ovšem všechny tyto změny byly přítomny pouze u jednoho nebo dvou pacientů. Proto z toho nelze odvodit, že jsou to změny obecně vznikající na počátku tumorigeneze, protože by jejich homogenní stav mohl být pouze náhodou a při větším počtu pacientů by mohly být přítomny i v heterogenním stavu.

Co se týče klinického hlediska, jsou významné především chromozomální změny, které jsou prognostickými faktory. Příkladem takové změny je zisk 1q, který byl potvrzen jako heterogenní ve studii Cresswell et al. 2016. Ti odebírali také 3 vzorky tkáně z jednoho nefroblastomu. V případech, kdy je odebrán a vyšetřen na přítomnost chromozomálních změn pouze jeden vzorek, může být změna snadno přehlédnuta.

Vzhledem k heterogenitě přítomných chromozomálních změn, včetně těch prognostických (např. zisk 1q, zisk genu *MYCN*, delecie 17p (gen *TP53*)), lze usuzovat, že je nutné vyšetření tumoru z více míst. Klinický význam těchto vyšetření však musí být posouzen v multicentrické studii (za účasti většího množství pracovišť). Vzhledem k četnosti nefroblastomu a výskytu chromozomálních změn není možné takovouto studii provést na jednom pracovišti.

7. Závěr

V této práci jsme se věnovali chromozomálním změnám přítomným v nefroblastomech. Dali jsme si za cíl prokázat jejich heterogenní stav v nefroblastomu, k čemuž jsme využili tumory, ze kterých byli odebrány tři vzorky tkáně z různých míst. Dále jsme se zaměřili na asociace chromozomálních změn s klinickými údaji pacientů. Přítomné chromozomální změny jsme vyšetřovali dvěma metodami (SNP array a MLPA), u kterých jsme určili shodu ve výsledcích.

Co se týče srovnání metod, přibližně ve 4 % případů se výsledky z nich neshodovaly, přičemž ve většině případů byla změna zachycena pouze metodou SNP array. Vzhledem k našim výsledkům tedy doporučujeme v klinické praxi využívat SNP array, pokud je to finančně možné. Je sice nákladnější, ale protože je schopna vyšetřit najednou celý genom, dokáže na rozdíl od MLPA zachytit i krátké změny, které vznikají v oblastech mezi nasedáním MLPA prób, a vyšetřit i zbylé oblasti, do kterých MLPA není navržena vůbec. I přesto je však stále vhodné doplnit vyšetření i o metodu MLPA vzhledem k tomu, že v několika vzorcích jsme pomocí ní zachytili změnu, kterou SNP array nezaznamenal. Jednu z našich hypotéz, že výsledky obou metod se budou ve sledovaných znacích shodovat, jsme tedy nepotvrdili.

Potvrdili jsme však druhou hypotézu o intratumorové heterogenitě v přítomných chromozomálních změnách, jelikož jsme našli velké množství delecí, zisků a LOH, které byly v nefroblastomech v heterogenním stavu. Jednou z takových změn byla pUPD 11p15. Nálezem heterogenity v této změně jsme zamítli teorii dosud uváděnou v literatuře, že vzniká na počátku vývoje nefroblastomu. V budoucnu se budeme touto změnou blíže zabývat. Na základě našich výsledků jsme také došli k názoru, že je vhodné odebírat a vyšetřovat větší množství vzorků z různých oblastí nefroblastomu.

Dále se nám podařilo potvrdit asociaci delece 22q s vyšším věkem v době diagnózy a anaplastickým typem nefroblastomu, o kterých je zmínka i v literatuře. Naopak souvislost zisku *MYCN* a delece genu *TP53*, které jsou také spojovány s anaplastickým typem, jsme neprokázali. To však může souviset s nízkým počtem pacientů. V budoucnu by bylo vhodné ověřit ostatní asociace, které nám vyšly statisticky významné, až budeme mít k dispozici více pacientů, abychom mohli vyloučit náhodnost těchto závislostí.

Podářilo se nám splnit všechny cíle, které jsme si pro tuto práci zadali. Co se týče hypotéz, potvrdili jsme pouze jednu z nich, zatímco druhu jsme zamítli.

8. Seznam použitých zkratek

<i>ABCA4</i>	gen ATP-binding cassette, subfamily A, member 4; ATP vázající transportér, podrodina A, člen 4
<i>AMER1</i>	gen APC membrane recruitment protein; membránový protein 1 přijímající APC
<i>APC</i>	protein adenomatous polyposis coli; adenomatózní polypóza coli
<i>ATP</i>	adenozintrifosfát
<i>BCL9</i>	gen B-cell CLL/lymphoma 9; CLL/lymfom b-lymfocytů 9
<i>bp</i>	páry bazí
<i>BWS</i>	Beckwith-Wiedemannův syndrom
<i>CDH1</i>	gen cadherin 1
<i>CHD5</i>	gen chromodomain helicase DNA binding protein 5; DNA vázající protein s chromodoménou a helikázovou doménou 5
<i>CLL</i>	chronic lymphocytic leukemia; chronická lymfocytární leukémie
<i>COG</i>	Children's Oncology Group; dětská onkologická skupina
<i>DDS</i>	Denys-Drashův syndrom
<i>DNA</i>	deoxyribonucleic acid ; deoxyribonukleová kyselina
<i>EFS</i>	event-free survival; přežití bez událostí
<i>FANCA</i>	gen Fanconi anemia complementation group A; Fanconiho anémie komplementační skupina A
<i>GRCh37</i>	Genome Reference Consortium Human Build 37; konsorcium refereneční mapy genomu člověka 37
<i>H19</i>	gen imprinted maternally expressed transcript; imprintovaný maternálně exprimovaný transkript
<i>HMGCS2</i>	gen 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A syntáza 2
<i>IC1</i>	imprintované centrum 1
<i>IC2</i>	imprintované centrum 2
<i>IGF2</i>	gen insulin-like growth factor 2; inzulínu podobný růstový faktor 2
<i>IRF6</i>	gen interferon regulatory factor 6; interferon regulační faktor 6

<i>KCNQ1</i>	gen potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1; draselný napětově řízený kanál, podrodina Q člen 1
<i>KIP2</i>	gen cyclin-dependent kinase inhibitor 1C; cyklin-dependentní kinázový inhibitor 1C
<i>KISS1</i>	gen KiSS-1 metastasis suppressor; KiSS-1 metastatický supresor
<i>LIT1</i>	gen KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1; transkript 1 opačného vlákna KCNQ1
LOH	loss of heterozygosity; ztráta heterozigosity
LOI	loss of imprinting; ztráta imprintingu
<i>MFN2</i>	gen mitofusin 2
<i>MIR34A</i>	gen micro RNA 34A
MLPA	multiplex ligation probe amplification; mnohonásobná ligační amplifikace
<i>MLYCD</i>	gen malonyl-CoA decarboxylase; malonyl-koenzym A dekarboxyláza
<i>MPZ</i>	gen myelin protein zero; myelinový protein nula
MYC	Myelocytomatosis
<i>MYCN</i>	onkogen, člen MYC rodiny
NCBI	National Center for Biotechnology Information; národní centrum pro biotechnologické informace
NR	nephrogenic rests; nefrogenní zbytky
NWTSG	National Wilms Tumor Study Group; národní skupina zabývající se Wilmsovým tumorem
OS	overall survival; celkové přežití
p53	protein 53
<i>PAX6</i>	gen paired box 6; obsahující tzv. párový box
PCR	polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce
pUPD	paternální uniparentální dizomie
RFU	relative fluorescence unit; relativní fluorescenční jednotka
rpm	revolution per minute; otáčky za minutu
RTSG	Renal Tumour Study Group; skupina zabývající se nádory ledvin
<i>SALL1</i>	gen sal-like 1; podobný genu <i>sal</i> drosophily 1

<i>SDCCAG8</i>	gen serologically defined colon cancer antigen 8; sérologicky definovaný antigen 8 rakoviny tračníku
SIOP	International Society of Paediatric Oncology; mezinárodní společnost pediatrické onkologie
<i>SLC12A3</i>	gen solute carrier family 12 member 3; transportér rozpuštěných látek (Na, Cl), rodina 12 člen 3
SNP	single nucleotide polymorphism; jednonukleotidový polymorfismus
<i>TK2</i>	gen thymidine kinase; thymidinová kináza
TNF	tumor necrosis factor; faktor nádorové nekrózy
<i>TNFRSF18</i>	gen TNF receptor superfamily member 18; superrodina TNF receptoru, člen 18
<i>TP53</i>	gen tumor protein 53; tumorový protein 53
UPD	uniparentální dizomie
WAGR	Wilmsův tumor-aniridie-genitální anomálie-retardace syndrom
wnt	Wingless/Int-1
<i>WNT4</i>	gen Wnt family member 4; člen 4 rodiny wnt
<i>WT1</i>	gen wilmsův tumor 1
WT1	oblast wilmsův tumor 1
WT2	oblast wilmsův tumor 2
<i>WTX</i>	gen wilmsův tumor na X chromosomu
x g	násobky g (gravitačního zrychlení země)

8. Reference

- AL-HUSSAIN, T., A. ALI a M. AKHTAR, 2014. Wilms Tumor : An Update. *Advances in Anatomic Pathology*. **21**(3), 166–173.
- BAIRD, P. N., A. SANTOS, N. GROVES, L. JADRESIC a J. K. COWELL, 1992. Constitutional mutations in the WT1 gene in patients with Denys-Drash syndrome. *Human Molecular Genetics* [online]. **1**(5), 301–305. ISSN 09646906. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/1.5.301
- BARBAUX, S., P. NIAUDET, M. GUBLER, J.-P. GRÜNFELD, F. JAUBERT, F. KUTTENN, C. N. FÉKÉTÉ, N. SOULEYREAU-THERVILLE, E. THIBAUD, M. FELLOUS a K. MCELREAVEY, 1997. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nature Genetics* [online]. **17**(4), 467–470. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng1297-467
- BARDEESY, N., D. FALKOFF, M. J. PETRUZZI, N. NOWAK, B. ZABEL, M. ADAM, M. C. AGUIAR, P. GRUNDY, T. SHOWS a J. PELLETIER, 1994. Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nature Genetics* [online]. **7**(1), 91–97. ISSN 15461718. Dostupné z: doi:10.1038/ng0594-91
- BARDEESY, N, J B BECKWITH a J PELLETIER, 1995. Clonal expansion and attenuated apoptosis in Wilms' tumors are associated with p53 gene mutations. *Cancer research* [online]. **55**(2), 215–9. ISSN 0008-5472. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7812946
- BECKWITH, J. B., 1993. Precursor Lesions of Wilms Tumor: Clinical and Biological Implications. *Medical and Pediatric Oncology* [online]. **21**(3), 158–168. ISSN 0098-1532. Dostupné z: doi:10.1002/mpo.2950210303
- BECKWITH, J. B., N. B. KIVIAT a J. F. BONADIO, 1990. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Embryology and Development*. **10**, 1–36.
- BECKWITH, J. B. a N. F. PALMER, 1978. Histopathology and Prognosis of Wilms Tumor: Results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer* [online]. **41**(5), 1937–1948. ISSN 10970142. Dostupné z: doi:10.1002/1097-0142(197805)41:5<1937::AID-CNCR2820410538>3.0.CO;2-U
- BEČVÁŘOVÁ, V., M. HYNEK, M. PUTZOVÁ, I. SOLDÁTOVÁ, J. HORÁČEK, D. SMETANOVÁ, E. KULOVANÝ, M. MATOUŠKOVÁ, V. KRUTÍLKOVÁ, E. HLAVOVÁ, D. RAŠKOVÁ, M. HEJTMÁNKOVÁ, K. ČUTKA, D. ČUTKA, D. STEJSKAL, R. MIHALOVÁ a M. TRKOVÁ, 2011. Aplikace metody SNP array v prenatalní diagnostice. *Česká gynekologie* [online]. **76**(4), 261–267. ISSN 1210-7832. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22026066

- BLIEK, J., S. M. MAAS, J. M. RUIJTER, R. C. HENNEKAM, M. ALDERS, A. WESTERVELD a M. M. MANNENS, 2001. Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Human Molecular Genetics*. **10**(5), 467–476. ISSN 0964-6906.
- BOWN, N., S. J. COTTERILL, P. ROBERTS, M. GRIFFITHS, S. LARKINS, S. HIBBERT, H. MIDDLETON, A. KELSEY, D. TRITTON a C. MITCHELL, 2002. Cytogenetic A and Clinical Outcome in Wilms Tumor: A Study by the U.K. Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Medical and Pediatric Oncology* [online]. **38**(1), 11–21. ISSN 00981532. Dostupné z: doi:10.1002/mpo.1258
- BRESLOW, N. E., R. NORRIS, P. A. NORKOOL, T. KANG, J. B. BECKWITH, E. J. PERLMAN, M. L. RITCHEY, D. M. GREEN a K. E. NICHOLS, 2003. Characteristics and Outcomes of Children With the Wilms tumor-Aniridia Syndrome: A Report From the National Wilms Tumor Study Group. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **21**(24), 4579–4585. ISSN 0732183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2003.06.096
- BUCKLER, A., J. PELLETIER, D. HABER, T. GLASER a D. HOUSMAN, 1991. Isolation, Characterization, and Expression of the Murine Wilms' Tumor Gene (WT1) During Kidney Development. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **11**(3), 1707–12. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=1671709%5Cnpapers3://publication/uuid/1E9099D2-5C01-4F7D-BD4C-92629909622A>
- CALL, K. M., T. GLASER, C. Y. ITO, A. J. BUCKLER, J. PELLETIER, D. A. HABER, E. A. ROSE, A. KRAL, H. YEGER, W. H. LEWIS, C. JONES a D. E. HOUSMAN, 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* [online]. **60**(3), 509–520. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90601-A](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90601-A)
- COPPE, M. J., J. DE KRAKER, P. J. VAN DIJKEN, H. J.M. PERRY, J. F.M. DELEMARRE, M. F. TOURNADE, J. LEMERLE a P. A. VOUTE, 1989. Bilateral Wilms' Tumor: Long-Term Survival and Some Epidemiological Features. *Journal of Clinical Oncology*. **7**(3), 310–315. ISSN 0732183X.
- CRESSWELL, G. D., J. R. APPS, T. CHAGTAI, B. MIFSUD, C. C. BENTLEY, M. MASCHIETTO, S. D. POPOV, M. E. WEEKS, Ø. E. OLSEN, N. J. SEBIRE, K. PRITCHARD-JONES, N. M. LUSCOMBE, R. D. WILLIAMS a W. MIFSUD, 2016. Intra-Tumor Genetic Heterogeneity in Wilms Tumor: Clonal Evolution and Clinical Implications. *EBioMedicine* [online]. **9**, 120–129. Dostupné z: doi:10.1016/j.ebiom.2016.05.029
- DAVIDOFF, A. M., 2009. Wilms Tumor. *Current Opinion in Pediatrics* [online]. **21**(3), 357–364.

- ISSN 1531-698X. Dostupné z: doi:10.1097/MOP.0b013e32832b323a.WILMS
- DELEMARRE, J. F. M., B. SANDSTEDT, D. HARMS, L. BOCCON-GIBOD a G. M. VUJANIC, 1996. The New SIOP (Stockholm) Working Classification of Renal Tumours of Childhood. *Medical and Pediatric Oncology* [online]. **26**(2), 145–146. ISSN 00981532. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1096-911X(199602)26:2<145::AID-MPO15>3.0.CO;2-H
- DRASH, A., F. SHERMAN, W. H. HARTMANN a R. M. BLIZZARD, 1970. A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *The Journal of Pediatrics* [online]. **76**(4), 585–593. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3476(70)80409-7
- ELDERING, E., C. A. SPEK, H. L. ABERSON, A. GRUMMELS, I. A. DERKS, Alex F. DE VOS, C. J. MCELGUNN a J. P. SCHOUTEN, 2003. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Research* [online]. **31**(23), e153. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gng153
- ELLIOTT, M., R. BAYLY, T. COLE, I. K. TEMPLE a E. R. MAHER, 1994. Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clinical Genetics* [online]. **46**(2), 168–174. ISSN 0009-9163. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0004.1994.tb04219.x
- FARIA, P., J. B. BECKWITH, K. MISHRA, C. ZUPPAN, D. A. WEEKS, N. BRESLOW a D. M. GREEN, 1996. Focal Versus Diffuse Anaplasia in Wilms Tumor - New Definitions with Prognostic Significance: A Report from the National Wilms Tumor Study Group. *The American Journal of Surgical Pathology*. **20**(8), 909–920.
- FEINBERG, A. P., 2000. The two-domain hypothesis in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **106**(6), 739–740. ISSN 00219738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI10912
- FRANCKE, U., L. B. HOLMES, L. ATKINS a V. M. RICCARDI, 1979. Aniridia-Wilms' tumor association: evidence for specific deletion of 11p13. *Cytogenetics and Cell Genetics* [online]. **24**(3), 185–192. ISSN 0301-0171. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=225131
- FREED-PASTOR, W. A. a C. PRIVES, 2012. Mutant p53 : one name , many proteins. *Genes and Development* [online]. **26**, 1268–1286. ISSN 1549-5477. Dostupné z: doi:10.1101/gad.190678.112
- FUKUZAWA, R., S. K. HOLMAN, C. W. CHOW, R. SAVARIRAYAN, A. E. REEVE a S. P. ROBERTSON, 2010. WTX mutations can occur both early and late in the pathogenesis of Wilms tumour.

- Journal of Medical Genetics* [online]. **47**(11), 791–794. ISSN 00222593. Dostupné z: doi:10.1136/jmg.2010.080663
- GARDINA, P. J., K. C. LO, W. LEE, J. K. COWELL a Y. TURPAZ, 2008. Ploidy status and copy number aberrations in primary glioblastomas defined by integrated analysis of allelic ratios, signal ratios and loss of heterozygosity using 500K SNP Mapping Arrays. *BMC Genomics* [online]. **9**, 489. ISSN 14712164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-9-489
- GARSON, J. A., J. A. VAN DEN BERGHE a J. T. KEMSHEAD, 1987. Novel non-isotopic in situ hybridization technique detects small (1 kb) unique sequences in routinely G-banded human chromosomes: Fine mapping of N-myc and β -NGF genes. *Nucleic Acids Research* [online]. **15**(12), 4761–4770. ISSN 03051048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/15.12.4761
- GERLINGER, M., A. J. ROWAN, S. HORSWELL, J. LARKIN, D. ENDESFELDER, E. GRONROOS, P. MARTINEZ, N. MATTHEWS, A. STEWART, P. TARPEY, I. VARELA, B. PHILLIMORE, S. BEGUM, N.Q. MCDONALD, A. BUTLER, D. JONES, K. RAINE, C. LATIMER, C. R. SANTOS, M. NOHADANI, A. C. EKLUND, B. SPENCER-DENE, G. CLARK, L. PICKERING, G. STAMP, Martin GORE, Z. SZALLASI, J. DOWNWARD, A. FUTREAL a C. SWANTON, 2012. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal of Medicine* [online]. **366**(10), 883–892. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1113205. Intratumor
- GESSLER, M., A. POUSTKA, W. CAVENEE, R. L. NEVE, S. H. ORKIN a G. A. BRUNS, 1990. Homozygous deletion in Wilms tumour of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*. **343**(4), 774–778.
- GOW, K. W. a J. J. MURPHY, 2002. Cytogenetic and Histologic Findings in Wilms' Tumor. *Journal of Pediatric Surgery* [online]. **37**(6), 823–827. ISSN 00223468. Dostupné z: doi:10.1053/jpsu.2002.32880
- GRATIAS, E. J., J. S. DOME, L. J. JENNINGS, Y. Y. CHI, J. TIAN, J. ANDERSON, P. GRUNDY, E. A. MULLEN, J. I. GELLER, C. V. FERNANDEZ a E. J. PERLMAN, 2016. Association of Chromosome 1q Gain With Inferior Survival in Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **34**(26), 3189–3194. ISSN 15277755. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2015.66.1140
- GRATIAS, E. J., L. J. JENNINGS, J. R. ANDERSON, J. S. DOME, P. GRUNDY a E. J. PERLMAN, 2013. Gain of 1q is Associated with Inferior Event-Free and Overall Survival in Favorable Histology Wilms Tumor: A Report from the Children's Oncology Group. *Cancer* [online]. **119**(21), 3887–3894. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.28239. Gain
- GREEN, D. M., N. E. BRESLOW, G. J. D'ANGIO, M. H. MALOGOLOWKIN, M. L. RITCHEY, A. E. EVANS, J. B. BECKWITH, E. J. PERLMAN, R. C. SHAMBERGER, S. PETERSON, P. E. GRUNDY, J. S.

- DOME, P. R. M. THOMAS a J. A. KALAPURAKAL, 2014. Outcome of patients with stage II/favorable histology Wilms tumor with and without local tumor spill. A report from the National Wilms Tumor Study Group. *Pediatric Blood and Cancer* [online]. **61**(1), 134–139. ISSN 15455017. Dostupné z: doi:10.1002/pbc.24658
- GROHMANN, A., K. TANNEBERGER, A. ALZNER, J. SCHNEIKERT a J. BEHRENS, 2007. AMER1 regulates the distribution of the tumor suppressor APC between microtubules and the plasma membrane. *Journal of Cell Science* [online]. **120**(21), 3738–3747. ISSN 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.011320
- GRUNDY, P.K., P. E. TELZEROW, N. BRESLOW, J. MOKSNESS, V. HUFF a M. C. PATERSON, 1994. Loss of Heterozygosity for Chromosomes 16q and ip in Wilms' Tumors Predicts an Adverse Outcome. *Cancer Research*. **54**(9), 2331–2333.
- GRUNDY, Paul E., Norman E. BRESLOW, Sierra LI, Elizabeth PERLMAN, J. Bruce BECKWITH, Michael L. RITCHEY, Robert C. SHAMBERGER, Gerald M. HAASE, Giulio J. D'ANGIO, Milton DONALDSON, Max J. COPPES, Marcio MALOGOLOWKIN, Patricia SHEARER, Patrick R M THOMAS, Roger MACKLIS, Gail TOMLINSON, Vicki HUFF a Daniel M. GREEN, 2005. Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: A report from the National Wilms Tumor Study Group. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **23**(29), 7312–7321. ISSN 0732183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2005.01.2799
- HABER, D. A., A. J. BUCKLER, T. GLASER, K. M. CALL, J. PELLETIER, R. L. SOHN, E. C. DOUGLASS a D. E. HOUSMAN, 1990. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* [online]. **61**(7), 1257–1269. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(90)90690-G
- HABER, D. A., R. L. SOHN, A. J. BUCKLER, J. PELLETIER, K. M. CALL a D. E. HOUSMAN, 1991. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* [online]. **88**(21), 9618–22. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.88.21.9618
- HAINAUT, P. a M. HOLLSTEIN, 2000. p53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations. *Advances in Cancer Research*. **77**, 81–137.
- HAN, J. C., 2016. Rare Syndromes and Common Variants of the Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene in Human Obesity. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [online]. B.m.: Elsevier Inc., **140**, 75–95. ISSN 1878-0814 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/bs.pmbts.2015.12.002
- HAWTHORN, L. a J. K. COWELL, 2011. Analysis of Wilms Tumors Using SNP Mapping Array- Based

- Comparative Genomic Hybridization. *PLoS ONE* [online]. **6**(4), e18941. ISSN 19326203.
Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0018941
- HENRY, I., C. BONAÏTI-PELLIÉ, V. CHEHENSSE, C. BELDJORD, C. SCHWARTZ, G. UTERMANN a C. JUNIEN, 1991. Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature* [online]. **351**(6328), 665–667. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/351665a0
- HING, S., Y.-J. LU, B. SUMMERSGILL, L. KING-UNDERWOOD, J. NICHOLSON, P. GRUNDY, R. GRUNDY, M. GESSLER, J. SHIPLEY a K. PRITCHARD-JONES, 2001. Gain of 1q Is Associated with Adverse Outcome in Favorable Histology Wilms' Tumors. *The American Journal of Pathology* [online]. **158**(2), 393–398. ISSN 00029440. Dostupné z: doi:10.1016/S0002-9440(10)63982-X
- HUFF, V., 1998. Wilms Tumor Genetics. *American Journal of Medical Genetics* [online]. **79**(4), 260–267. ISSN 01487299. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19981002)79:4<260::AID-AJMG6>3.0.CO;2-Q
- CHAGTAI, T., C. ZILL, L. DAINESE, J. WEGERT, S. SAVOLA, S. POPOV, W. MIFSUD, G. VUJANIĆ, N. SEBIRE, Y. LE BOUC, P. F. AMBROS, L. KAGER, M. J. O'SULLIVAN, A. BLAISE, C. BERGERON, L. H. MENGELBIER, D. GISSELSOON, M. KOOL, G. A.M. TYTGAT, M. M. VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, N. GRAF, H. VAN TINTEREN, A. COULOMB, M. GESSLER, R. D. WILLIAMS a K. PRITCHARD-JONES, 2016. Gain of 1q As a Prognostic Biomarker in Wilms Tumors (WTs) Treated With Preoperative Chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP)WT2001 Trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **34**(26), 3195–3203. ISSN 15277755. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2015.66.0001
- CHARLES, A. K., K. W. BROWN a P. J. BERRY, 1998. Microdissecting the Genetic Events in Nephrogenic Rests and Wilms' Tumor Development. *American Journal of Pathology* [online]. B.m.: American Society for Investigative Pathology, **153**(3), 991–1000. ISSN 00029440. Dostupné z: doi:10.1016/S0002-9440(10)65641-6
- JADALI, F., D. SAYADPOUR, M. RAKHSHAN, A. KARIMI, M. ROUZROKH, B. S. SHAMSIAN a A. R. SHAMSHIRI, 2011. Immunohistochemical Detection of p53 Protein Expression as a Prognostic Factor in Wilms Tumor. *Iranian Journal of Kidney Diseases* [online]. **5**(3), 149–153. ISSN 1735-8604. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21525573
- JEFFREY, P.D., S. GORINA a N.P. PAVLETICH, 1995. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*. **267**, 1498–1502.
- KANEKO, Y., K. KONDO, J. D. ROWLEY, J. W. MOOHR a H. S. MAURER, 1983. Further Chromosome Studies on Wilms' Tumor Cells of Patients Without Aniridia. *Cancer Genetics and*

- Cytogenetics* [online]. **10**(2), 191–197. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6311403>
- KLAMT, B., M. SCHULZE, C. THÄTE, J. MARES, P. GOETZ, R. KODET, W. SCHEURLEN, A. WEIRICH, N. GRAF a M. GESSLER, 1998. Allele Loss in Wilms Tumors of Chromosome Arms 11q, 16q, and 22q Correlates With Clinicopathological Parameters. Allele Loss in Wilms Tumors of Chromosome Arms 11q, 16q, and 22q Correlates With Clinicopathological Parameters *Genes, Chromosomes and Cancer* [online]. **22**(4), 287–294. Dostupné z: [10.1002/\(SICI\)1098-2264\(199808\)22:4<287::AID-GCC4>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(199808)22:4<287::AID-GCC4>3.0.CO;2-R)
- KOZIELL, A., E. CHARMANDARI, P. C. HINDMARSH, L. REES, P. SCAMBLER a C. G.D. BROOK, 2000. Frasier syndrome, part of the Denys Drash continuum or simply a WT1 gene associated disorder of intersex and nephropathy? *Clinical Endocrinology* [online]. **52**(4), 519–524. ISSN 03000664. Dostupné z: [doi:10.1046/j.1365-2265.2000.00980.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2000.00980.x)
- KRAUS, Jurgen A., Steffen ALBRECHT, Otmar D. WIESTLER, Dietrich VON SCHWEINITZ a Torsten PIETSCH, 1996. LOSS OF HETEROZYGOSITY ON CHROMOSOME 1 IN HUMAN HEPATOBLASTOMA. *Int. J. Cancer* [online]. **67**, 467–471. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15133848
- KREIDBERG, J. A., H. SARIOLA, J. M. LORING, M. MAEDA, J. PELLETIER, D. HOUSMAN a R. JAENISCH, 1993. WT-1 Is Required for Early Kidney Development. *Cell* [online]. **74**(4), 679–691. ISSN 00928674. Dostupné z: [doi:10.1016/0092-8674\(93\)90515-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90515-R)
- KULLENDORFF, C.-M., M. SOLLER, T. WIEBE a F. MERTENS, 2003. Cytogenetic findings and clinical course in a consecutive series of Wilms tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics* [online]. **140**, 82–87. ISSN 01654608. Dostupné z: [doi:10.1016/S0165-4608\(02\)00635-0](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(02)00635-0)
- LAFRAMBOISE, Thomas, 2009. Single nucleotide polymorphism arrays: A decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research* [online]. **37**(13), 4181–4193. ISSN 03051048. Dostupné z: [doi:10.1093/nar/gkp552](https://doi.org/10.1093/nar/gkp552)
- LAHOTI, C., P. THORNER, D. MALKIN a H. YEGER, 1996. Immunohistochemical detection of p53 in Wilms' tumors correlates with unfavorable outcome. *The American Journal of Pathology* [online]. **148**(5), 1577–89. ISSN 0002-9440. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1861544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- LAPTENKO, O. a C. PRIVES, 2006. Transcriptional regulation by p53: One protein, many possibilities. *Cell Death and Differentiation* [online]. **13**(6), 951–961. ISSN 13509047. Dostupné z: [doi:10.1038/sj.cdd.4401916](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401916)

- LITTLE, M. a C. WELLS, 1997. A Clinical Overview of WT 1 Gene Mutations. *Human Mutation*. **9**, 209–225.
- MAJOR, M. B., N. D. CAMP, J. D. BERNDT, X. H. YI, S. J. GOLDENBERG, C. HUBBERT, T. L. BIECHELE, A.-C. GINGRAS, N. ZHENG, M. J. MACCOSS, S. ANGERS a R.T. MOON, 2007. Wilms Tumor Suppressor WTX Negatively Regulates WNT/b-Catenin Signaling. *Science*. **316**, 1043–1047.
- MALKIN, D., F.P. LI, L. C. STRONG, J. F. FRAUMENI, C. E. NELSON, D. H. KIM, J. KASSEL, M. A. GRYKA, F. Z. BISCHOFF a M. A. TAINSKY, 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* [online]. **250**(4985), 1233–1238. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1978757
- MATHSYARAJA, H. a R.N. EISENMAN, 2016. Parsing Myc Paralogs in Oncogenesis. *Cancer Cell* [online]. B.m.: Elsevier Inc., **29**(1), 1–2. ISSN 18783686. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2015.12.009
- MD ZIN, R., A. MURCH a A. CHARLES, 2011. Pathology, genetics and cytogenetics of Wilms' tumour. *Pathology* [online]. **43**(4), 302–312. ISSN 1465-3931. Dostupné z: doi:10.1097/PAT.0b013e3283463575
- MENKE, A., L. MCINNES, N. D. HASTIE a A. SCHEDL, 1998. The Wilms' tumor suppressor WT1: Approaches to gene function. *Kidney International* [online]. **53**(6), 1512–1518. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00935.x
- MERKS, J. H. M., H. N. CARON a R.C.M. HENNEKAM, 2005. High Incidence of Malformation Syndromes in a Series of 1,073 Children With Cancer. *American Journal of Medical Genetics* [online]. **134 A**(2), 132–143. ISSN 15524825. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.a.30603
- MESSAHEL, B., R. WILLIAMS, A. RIDOLFI, R. A'HERN, W. WARREN, L. TINWORTH, R. HOBSON, R. AL-SAAD, G. WHYMAN, M. A. BRUNDLER, A. KELSEY, N. SEBIRE, C. JONES, G. VUJANIC a K. PRITCHARD-JONES, 2009. Allele loss at 16q defines poorer prognosis Wilms tumour irrespective of treatment approach in the UKW1-3 clinical trials: A Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG) study. *European Journal of Cancer* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, **45**(5), 819–826. ISSN 09598049. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2009.01.005
- MICALE, M. A., B. EMBREY, J. K. MACKNIS, C. E. HARPER a D. J. AUGHTON, 2016. Constitutional 560.49 kb chromosome 2p24.3 duplication including the MYCN gene identified by SNP chromosome microarray analysis in a child with multiple congenital anomalies and bilateral Wilms tumor. *European Journal of Medical Genetics* [online]. B.m.: Elsevier Masson SAS, **59**(12), 618–623. ISSN 18780849. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmg.2016.10.010
- MITRY, E., L. CICCOLALLO, M. P. COLEMAN, G. GATTA a K. PRITCHARD-JONES, 2006. Incidence of and survival from Wilms' tumour in adults in Europe: Data from the EUROCARE study.

- European Journal of Cancer* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, **42**(14), 2363–2368. ISSN 09598049.
Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2006.04.009
- MOULTON, T., T. CRENSHAW, Y. HAO, J. MOOSIKASUWAN, N. LIN, F. DEMBITZER, T. HENSLE, L. WEISS, L. MCMORROW, T. LOEW, W. KRAUS, W. GERALD a B. TYCKO, 1994. Epigenetic lesions at the H19 locus in Wilms' tumour patients. *Nature Genetics* [online]. **7**(3), 440–447. ISSN 15461718. Dostupné z: doi:10.1038/ng0794-440
- MROWKA, C. a A. SCHEDL, 2000. Wilms' Tumor Suppressor Gene WT1: From Structure to Renal Pathophysiologic Features. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **11**(Suppl 16), S106–S115. ISSN 1046-6673. Dostupné z: <http://www.google.com/search?client=safari&rls=en-us&q=Wilms'+tumor+suppressor+gene+WT1:+from+structure+to+renal+pathophysiologic+features&ie=UTF-8&oe=UTF-8%5Cnpapers3://publication/uuid/C389DDFA-E6F6-49B4-BOBE-9665EFC52198>
- NAROD, S. A., M. M. HAWKINS, C. M. ROBERTSON a C. A. STILLER, 1997. Congenital Anomalies and Childhood Cancer in Great Britain. *American Journal of Human Genetics* [online]. **60**(3), 474–85. ISSN 0002-9297. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1712528&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- NATRAJAN, R., R. D. WILLIAMS, S. N. HING, A. MACKAY, J. S. REIS-FILHO, K. FENWICK, M. IRAVANI, H. VALGEIRSSON, A. GRIGORIADIS, C. F. LANGFORD, O. DOVEY, S. G. GREGORY, B. L. WEBER, A. ASHWORTH, P. E. GRUNDY, K. PRITCHARD-JONES a C. JONES, 2006. Array CGH profiling of favourable histology Wilms tumours reveals novel gains and losses associated with relapse. *The Journal of pathology* [online]. **210**, 49–58. ISSN 1096-9896. Dostupné z: doi:10.1002/path
- NATRAJAN, R, S E LITTLE, N SODHA, J S REIS-FILHO, A MACKAY, K FENWICK, A ASHWORTH, E J PERLMAN, J S DOME, P E GRUNDY, K PRITCHARD-JONES a C JONES, 2007. Analysis by array CGH of genomic changes associated with the progression or relapse of Wilms' tumour. *The Journal of pathology* [online]. **211**, 52–59. ISSN 1096-9896. Dostupné z: doi:10.1002/path
- NISEN, P. D., K. A. ZIMMERMAN, S. V. COTTER, F. GILBERT a F. W. ALT, 1986. Enhanced Expression of the N-myc Gene in Wilms' Tumors. *Cancer Research*. **46**, 6217–6222. ISSN 15387445.
- NYGREN, A. O. H., N. AMEZIANE, H. M. B. DUARTE, R. N. C. P. VIJZELAAR, Q. WAISFISZ, C. J. HESS, J.P. SCHOUTEN a A. ERRAMI, 2005. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): Simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Research* [online]. **33**(14), 1–9. ISSN 03051048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gni127

- OKUBO, T., P. S. KNOEPFLER, R. N. EISENMAN a B. L. M. HOGAN, 2005. Nmyc plays an essential role during lung development as a dosage-sensitive regulator of progenitor cell proliferation and differentiation. *Development* [online]. **132**(6), 1363–1374. ISSN 0950-1991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.01678
- PARK, S., A. BERNARD, K. E. BOVE, D. A. SENS, D. J. HAZEN-MARTIN, A. J. GARVIN a D.A. HABER, 1993. Inactivation of WT1 in nephrogenic rests, genetic precursors to Wilms' tumour. *Nature Genetics* [online]. **5**(4), 363–367. ISSN 15461718. Dostupné z: doi:10.1038/ng1293-363
- PELLETIER, J., W. BRUENING, C. E. KASHTAN, S. M. MAUER, J. C. MANIVEL, J. E. STRIEGEL, D. C. HOUGHTON, C. JUNIEN, R. HABIB, L. FOUSER, R. N. FINE, B. L. SILVERMAN, D. A. HABER a D. HOUSMAN, 1991. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* [online]. **67**(2), 437–447. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:0092-8674(91)90194-4 [pii]
- PEROTTI, D., B. GAMBA, M. SARDELLA, F. SPREAFICO, M. TEREZIANI, P. COLLINI, A. PESSION, M. NANTRON, F. FOSSATI-BELLANI a P. RADICE, 2008. Functional inactivation of the WTX gene is not a frequent event in Wilms' tumors. *Oncogene* [online]. **27**(33), 4625–4632. ISSN 09509232. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2008.93
- PETITJEAN, A., E. MATHE, S. KATO, C. ISHIOKA, S. V. TAVTIGIAN, P. HAINAUT a M. OLIVIER, 2007. Impact of Mutant p53 Functional Properties on Mutation Patterns and Tumor Phenotype: Lessons from Recent Developments in the IARC TP53 Database. *Human Mutation* [online]. **28**(6), 622–629. ISSN 03645134. Dostupné z: doi:10.1002/humu
- PETTENATI, M. J., J. L. HAINES, R. R. HIGGINS, R. S. WAPPNER, C. G. PALMER a D. D. WEAVER, 1986. Wiedemann-Beckwith syndrome: presentation of clinical and cytogenetic data on 22 new cases and review of the literature. *Human Genetics* [online]. **74**(2), 143–154. ISSN 03406717. Dostupné z: doi:10.1007/BF00282078
- PRITCHARD-JONES, K., S. FLEMING, D. DAVIDSON, W. BICKMORE, D. PORTEOUS, C. GOSDEN, J. BARD, A. BUCKLER, J. PELLETIER a D. HOUSMAN, 1990. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* [online]. **346**(6280), 194–197. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/346194a0
- PRITCHARD-JONES, K. a J. PRITCHARD, 2004. Success of clinical trials in childhood Wilms' tumour around the world. *Lancet*. **364**, 1468–1470.
- RAINIER, S., L. A. JOHNSON, C. J. DOBRY, A. J. PING, P. E. GRUNDY a A. P. FEINBERG, 1993. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* [online]. **362**(6422), 747–9. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/362747a0

- REDDY, J. C. a J. D. LICHT, 1996. The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: How much do we really know? *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. **1287**(1), 1–28. ISSN 0006-3002. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8639704>
- RICCARDI, V. M., E. SUJANSKY, A. C. SMITH a U. FRANCKE, 1978. Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics*. **61**(4), 604–610. ISSN 0031-4005.
- RITCHEY, M. L., R. C. SHAMBERGER, T. HAMILTON, G. HAASE, P. ARGANI a S. PETERSON, 2005. Fate of Bilateral Renal Lesions Missed on Preoperative Imaging: a Report From the National Wilms Tumor Study Group. *The Journal of Urology* [online]. **174**(4), 1519–1521. ISSN 00225347. Dostupné z: [doi:10.1097/01.ju.0000179536.97629.c5](https://doi.org/10.1097/01.ju.0000179536.97629.c5)
- RIVERA, Miguel N, Woo Jae KIM, Julie WELLS, David R DRISCOLL, Brian W BRANNIGAN, Moonjoo HAN, James C KIM, Andrew P FEINBERG, William L GERALD, Sara O VARGAS, Lynda CHIN, A John IAFRATE, Daphne W BELL a Daniel A HABER, 2007. An X chromosome gene, WT1, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **315**(5812), 642–5. ISSN 1095-9203. Dostupné z: [doi:10.1126/science.1137509](https://doi.org/10.1126/science.1137509)
- ROSE, E. A., T. GLASER, C. JONES, C. L. SMITH, W. H. LEWIS, K. M. CALL, M. MINDEN, E. CHAMPAGNE, L. BONETTA, H. YEGER a D. HOUSMAN, 1990. Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell* [online]. **60**(3), 495–508. ISSN 00928674. Dostupné z: [doi:10.1016/0092-8674\(90\)90600-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90600-J)
- RUIZ-PÉREZ, M. V., A. B. HENLEY a M. ARSENIAN-HENRIKSSON, 2017. The MYCN Protein in Health and Disease. *Genes* [online]. **8**(4), 1–27. ISSN 20734425. Dostupné z: [doi:10.3390/genes8040113](https://doi.org/10.3390/genes8040113)
- SCOTT, R. H., A. MURRAY, L. BASKCOMB, C. TURNBULL, C. LOVEDAY, R. AL-SAAD, R. WILLIAMS, F. BREATNACH, M. GERRARD, J. HALE, J. KOHLER, P. LAPUNZINA, G. A. LEVITT, S. PICTON, B. PIZER, M. D. RONGHE, H. TRAUNECKER, D. WILLIAMS, A. KELSEY, G. M. VUJANIC, N. J. SEBIRE, P. GRUNDY, C. A. STILLER, K. PRITCHARD-JONES, J. DOUGLAS a N. RAHMAN, 2012. Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget* [online]. **3**(3), 327–335. ISSN 1949-2553. Dostupné z: [doi:468 \[pii\]](https://doi.org/10.468)
- SCOTT, R. H., C. A. STILLER, L. WALKER a N. RAHMAN, 2006. Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumour. *Journal of Medical Genetics* [online]. **43**(9), 705–715. ISSN 1468-6244. Dostupné z: [doi:10.1136/jmg.2006.041723](https://doi.org/10.1136/jmg.2006.041723)
- SEGERS, H., R. KERSSEBOOM, M. ALDERS, R. PIETERS, A. WAGNER a M. M. VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, 2012. Frequency of WT1 and 11p15 constitutional aberrations and phenotypic correlation in childhood Wilms tumour patients. *European Journal of Cancer* [online]. B.m.:

- Elsevier Ltd, **48**(17), 3249–3256. ISSN 09598049. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2012.06.008
- SEGERS, H., M. M. VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, R. D. WILLIAMS, H. VAN TINTEREN, G. VUJANIC, R. PIETERS, K. PRITCHARD-JONES a N. BOWN, 2013. Gain of 1q Is a Marker of Poor Prognosis in Wilms' Tumors. *Genes, chromosomes & cancer* [online]. **52**, 1065–1074. ISSN 10452257. Dostupné z: doi:10.1002/gcc
- SHLUSH, L. I. a D. HERSHKOVITZ, 2015. Clonal Evolution Models of Tumor Heterogeneity. *ASCO educational book* [online]. 662–665. ISSN 1548-8756 (Electronic) 1548-8748 (Linking). Dostupné z: doi:10.14694/EdBook_AM.2015.35.e662
- SCHOUTEN, J. P., C. J. MCELGUNN, R. WAAIJER, D. ZWIJNENBURG, F. DIEPVENS a G. PALS, 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* [online]. **30**(12), e57. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gnf056
- SCHWAB, M., H. E. VARMUS, J. M. BISHOP, K.-H. GRZESCHIK, S. L. NAYLOR, A. Y. SAKAGUCHII, G. BRODEUR a J. TRENT, 1984. Chromosomal localization in normal human cell and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature*. **308**(5956), 288–291.
- SPREAFICO, F., B. GAMBA, L. MARIANI, P. COLLINI, P. D'ANGELO, A. PESSION, A. DI CATALDO, P. INDOLFI, M. NANTRON, M. TEREZIANI, C. MOROSI, P. RADICE a D. PEROTTI, 2013. Loss of Heterozygosity Analysis at Different Chromosome Regions in Wilms Tumor Confirms 1p Allelic Loss as a Marker of Worse Prognosis: A Study from the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology. *Journal of Urology* [online]. B.m.: Elsevier Inc., **189**(1), 260–267. ISSN 00225347. Dostupné z: doi:10.1016/j.juro.2012.09.009
- SREDNI, S. T., B. DE CAMARGO, L. F. LOPES, R. TEIXEIRA a A. SIMPSON, 2001. Immunohistochemical Detection of p53 Protein Expression as a Prognostic Indicator in Wilms Tumor. *Medical and Pediatric Oncology*. **37**, 455–458.
- SRIVASTAVA, S., Z. ZOU, K. PIROLLO, W. BLATTNER a E. sther H. CHANG, 1990. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li–Fraumeni syndrome. *Nature* [online]. **348**, 747–749. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/348747a0
- STEENMAN, M. J.C., S. RAINIER, C. J. DOBRY, P. GRUNDY, I. L. HORON a A. P. FEINBERG, 1994. Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour. *Nature Genetics* [online]. **7**(3), 433–439. ISSN 15461718. Dostupné z: doi:10.1038/ng0794-433
- STEENMAN, M., B. REDEKER, M. DE MEULEMEESTER, K. WIESMEIJER, P. A. VOUTE, A. WESTERVELD, R. SLATER a M. MANNENS, 1997. Comparative genomic hybridization analysis

- of Wilms tumors. *Cytogenetics and Cell Genetics*. **77**, 296–303.
- STEINBERG, R., E. FREUD, M. ZER, I. ZIPERMAN, Y. GOSHEN, S. ASH, J. STEIN, R. ZAIZOV a S. AVIGAD, 2000. High Frequency of Loss of Heterozygosity for 1p35–p36 (D1S247) in Wilms Tumor. *Cancer Genetics and Cytogenetics* [online]. **117**(2), 136–139. ISSN 01654608. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-4608(99)00165-X
- STILLER, C. A. a D. M. PARKIN, 1990. International variations in the incidence of childhood renal tumours. *British Journal of Cancer* [online]. **62**, 1026–1030. ISSN 13653016. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-3016.1994.tb00439.x
- TAMIMI, Y., K. ZIEBART, N. DESAULNIERS, K. DIETRICH a P. GRUNDY, 2007. Identification of a Minimal Region of Loss on the Short Arm of Chromosome 1 in Wilms Tumor. *Genes, chromosomes & cancer* [online]. **46**, 327–335. ISSN 10452257. Dostupné z: doi:10.1002/gcc
- THUREAU, C. An overview of Illumina’s Microarrays Product used in Clinical Settings. In: *Illumina* [online]. 2009 [cit. 2018-07-23]. Dostupné z: https://www.illumina.com/documents/seminars/presentations/2010-05_sq_thureau_8.pdf
- TON, C. C. T., H. HIRVONEN, H. MIWA, M. M. WEIL, P. MONAGHAN, T. JORDAN, V. VAN HEYNINGEN, N. D. HASTIE, H. MEIJERS-HEIJBOER, M. DRECHSLER, B. rigitte ROYER-POKORA, F. COLLINS, A. SWAROOP, L. C. STRONG a G. F. SAUNDERS, 1991. Positional Cloning and Characterization of a Paired Box- and Homeobox-Containing Gene from the Aniridia Region. *Cell* [online]. **67**(6), 1059–1074. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(91)90284-6
- UMBRELLA PROTOCOL SIOP-RTSG 2016: *Integrated research and guidelines for standardized diagnostics and therapy*. SIOP, 2016.
- VARANASI, R., N. BARDEESY, M. GHAREMANI, M. J. PETRUZZI, N. NOWAK, M. A. ADAM, P. GRUNDY, T. B. SHOWS a J. PELLETIER, 1994. Fine structure analysis of the WT1 gene in sporadic Wilms tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **91**(9), 3554–8. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.9.3554
- VOGELSTEIN, B., D. LANE a A. J. LEVINE, 2000. Surfing the p53 network. *Nature* [online]. **408**(6810), 307–310. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/35042675
- VUJANIĆ, G. M., 2009. Renal tumours of childhood: an overview. *Diagnostic Histopathology* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, **15**(11), 501–509. ISSN 17562317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpdhp.2009.08.002
- VUJANIC, G. M., B. SANDSTEDT, D. HARMS, I. LEUSCHNER, A. KELSEY a J. DE KRAKER, 2002. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) Working Classification of Renal

- Tumors of Childhood. *Medical and Pediatric Oncology* [online]. **38**(2), 79–82.
ISSN 00981532. Dostupné z: doi:10.1002/mpo.1276
- WEGERT, J., C. VOKUHL, B. ZIEGLER, K. ERNESTUS, I. LEUSCHNER, R. FURTWÄNGLER, N. GRAF a M. GESSLER, 2017. TP53 alterations in Wilms tumour represent progression events with strong intratumour heterogeneity that are closely linked but not limited to anaplasia. *The Journal of Pathology: Clinical Research* [online]. **3**, 234–248. Dostupné z: doi:10.1002/cjp2.77
- WEGERT, J., S. WITTMANN, I. LEUSCHNER, E. GEISSINGER, N. GRAF a M. GESSLER, 2009. WTX Inactivation Is a Frequent, but Late Event in Wilms Tumors Without Apparent Clinical Impact. *Genes, chromosomes & cancer* [online]. **48**, 1102–1111. ISSN 10452257. Dostupné z: doi:10.1002/gcc
- WEIRICH, A., I. LEUSCHNER, D. HARMS, G. M. VUJANIC, J. TRÖGER, U. ABEL, N. GRAF, D. SCHMIDT, R. LUDWIG a P. A. VOUTE, 2001. Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. *Annals of Oncology* [online]. **12**(3), 311–319. ISSN 09237534. Dostupné z: doi:10.1023/A:1011167924230
- WEKSBURG, R., C. SHUMAN a J. B. BECKWITH, 2010. Beckwith-Wiedemann syndrome. *European Journal of Human Genetics* [online]. **18**(1), 8–14. ISSN 10184813. Dostupné z: doi:10.1038/ejhg.2009.106
- WEKSBURG, R., C. SHUMAN a A. C. SMITH, 2005. Beckwith-Wiedemann syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* [online]. **137C**(1), 12–23. ISSN 1552-4868. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.c.30058
- WIEDEMANN, H. R., 1983. Tumours and hemihypertrophy associated with Wiedemann-Beckwith syndrome. *European Journal of Pediatrics* [online]. **141**(2), 129. ISSN 03406199. Dostupné z: doi:10.1007/BF00496807
- WILDE, B. R. a D. E. AYER, 2015. Interactions between Myc and MondoA transcription factors in metabolism and tumourigenesis. *British Journal of Cancer* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, **113**(11), 1529–1533. ISSN 15321827. Dostupné z: doi:10.1038/bjc.2015.360
- WILLIAMS, R. D., R. AL-SAAD, T. ASNIM CHAGTAI, S. POPOV, B. MESSAHEL, N. SEBIRE, M. GESSLER, J. WEGERT, N. GRAF, I. LEUSCHNER, M. HUBANK, C. JONES, G. VUJANIC a K. PRITCHARD-JONES, 2010. Subtype-specific FBXW7 mutation and MYCN copy number gain in Wilms tumour. *Clinical Cancer Research* [online]. **16**(7), 2036–2045. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2890.Subtype-specific
- WILLIAMS, R. D., R. AL-SAAD, R. NATRAJAN, A. MACKAY, T. CHAGTAI, S. LITTLE, S. N. HING, K. FENWICK, A. ASHWORTH, P. GRUNDY, J. R. ANDERSON, J. S. DOME, E. J. PERLMAN, C. JONES

- a K. PRITCHARD-JONES, 2011. Molecular Profiling Reveals Frequent Gain of MYCN and Anaplasia-Specific Loss of 4q and 14q in Wilms Tumor. *Genes, chromosomes & cancer* [online]. **50**, 982–995. ISSN 10452257. Dostupné z: doi:10.1002/gcc
- WILLIAMS, R. D., S. N. HING, B. T. GREER, C. C. WHITEFORD, J. S. WEI, R. NATRAJAN, A. KELSEY, S. ROGERS, C. CAMPBELL, K. PRITCHARD-JONES a J. KHAN, 2004. Prognostic Classification of Relapsing Favorable Histology Wilms Tumor Using cDNA Microarray Expression Profiling and Support Vector Machines. *Genes, chromosomes & cancer* [online]. **41**(1), 65–79. ISSN 10452257. Dostupné z: doi:10.1002/gcc.20060
- WILLIAMS, R. D., T. CHAGTAI, M. ALCAIDE-GERMAN, J. APPS, J. WEGERT, S. POPOV, G. VUJANIC, H. VAN TINTEREN, M. M VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. KOOL, J. DE KRAKER, D. GISSELSOON, N. GRAF, M. GESSLER a K. PRITCHARD-JONES, 2015. Multiple mechanisms of MYCN dysregulation in Wilms tumour. *Oncotarget* [online]. **6**(9), 7232–43. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.3377
- WITTMANN, Stefanie, Birgit ZIRN, Muhannad ALKASSAR, Peter AMBROS, Norbert GRAF a Manfred GESSLER, 2007. Loss of 11q and 16q in Wilms Tumors Is Associated with Anaplasia, Tumor Recurrence, and Poor Prognosis. *Genes, chromosomes & cancer* [online]. **46**, 163–170. ISSN 10452257. Dostupné z: doi:10.1002/gcc
- ZUPPAN, C.W., J. B. BECKWITH a D. W. LUCKEY, 1988. Anaplasia in Unilateral Wilms' Tumor: A Report From the National Wilms' Tumor Study Pathology Center. *Human Pathology* [online]. **19**(10), 1199–1209. ISSN 00468177. Dostupné z: doi:10.1016/S0046-8177(88)80152-7

9. Internetové zdroje

- Biogen. *Biogen: Molekulární biologie a genetika* [online]. Praha, 2018 [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: <https://biogen.cz/obecny-mlpa-protokol-navod-pro-pouziti>
- Coffalyzer.net Reference Manual. *MRC-Holland: MLPA®* [online]. Amsterdam, c2018 [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: https://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_6MeHxYlkoncoMKK1IyFiV39nXfMTaq_nRogdkjJ91hKIMOZ4KsjoeA..
- GeneCards. *GeneCards®: Human Gene Database* [online]. Rehovot: Weizmann Institute of Science, c1996-2018 [cit. 2018-08-07]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/>
- Infinium® HD Assay Super Protocol Guide. *Illumina* [online]. 2015 [cit. 2018-07-23]. Dostupné z: <http://emea.support.illumina.com/array/documentation.html>
- Lift Genome Annotations. In: *University of California Santa Cruz* [online]. Santa Cruz, c2000-2018 [cit. 2018-06-30]. Dostupné z: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>
- MRC-Holland. *MRC-Holland: MLPA®* [online]. Amsterdam, c2018 [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: https://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_wl2zCjirCGANQgZPuTixsEyIW1MscfzuKj2NDFYc-g.
- OMIM. *OMIM®* [online]. Johns Hopkins University, c1966-2018 [cit. 2018-02-15]. Dostupné z: <https://www.omim.org/>
- University of California Santa Cruz: Genome Browser Gateway. In: *University of California Santa Cruz* [online]. Santa Cruz, c2000-2018 [cit. 2018-06-30]. Dostupné z: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

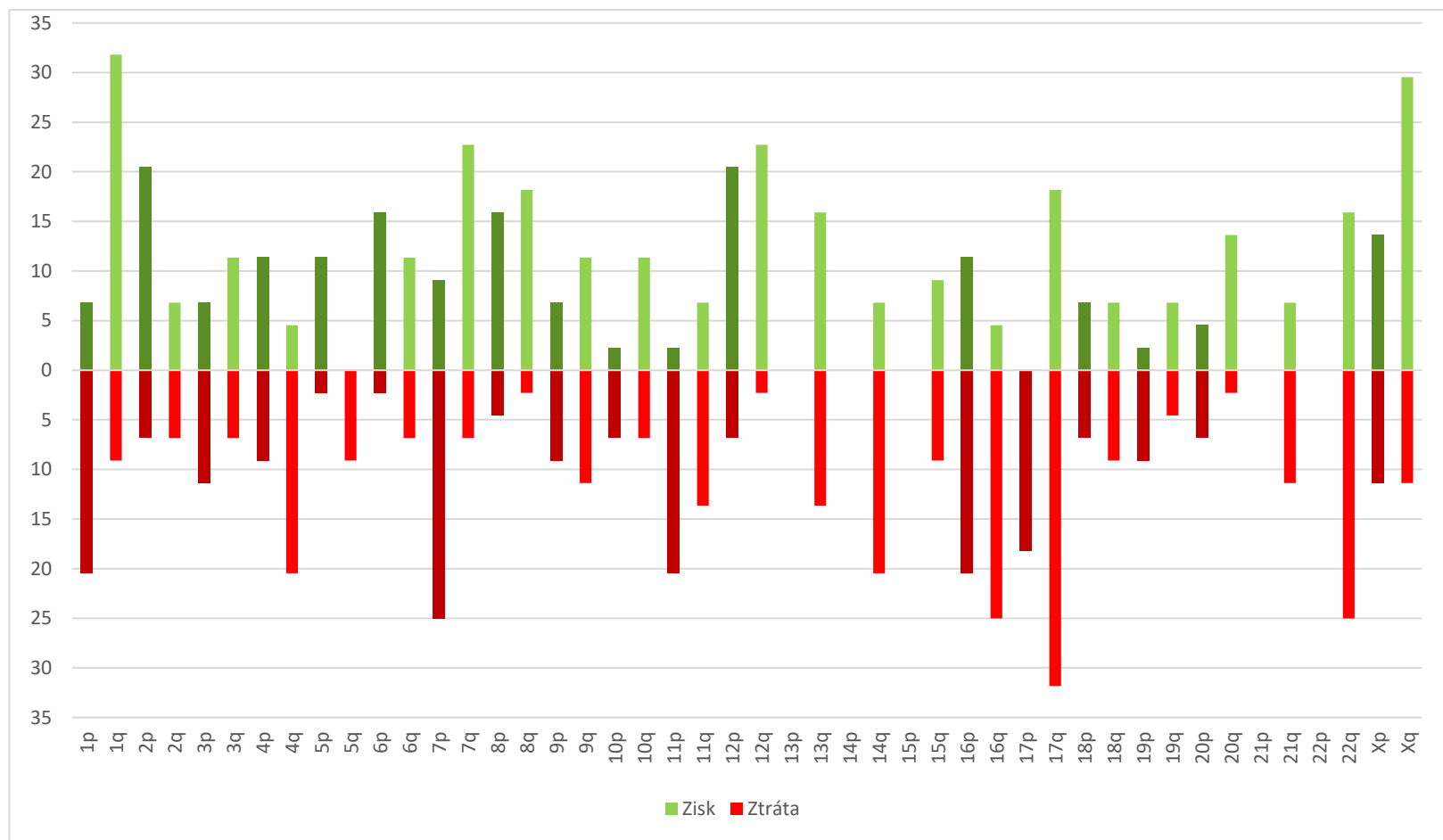
10. Přílohy

Tab. 25: Přehled všech změn nalezených u 44 pacientů

V tabulce jsou uvedeny změny (zisky a delece) nalezené na krátkých a dlouhých raménkách jednotlivých chromozomů. U každé změny je zaznamenán počet pacientů, u kterých byla daná změna nalezena a jejich procentuální podíl ze všech 44 pacientů. Barevně jsou vyznačeny změny, které se vyskytovaly u více než 20 % pacientů.

Chromozom	Změna	Krátké raménko (p)		Dlouhé raménko (q)	
		Počet pacientů	Procentuální podíl ze všech pacientů (%)	Počet pacientů	Procentuální podíl ze všech pacientů (%)
1	Zisk	3	6,82	14	31,82
	Delece	9	20,45	4	9,09
2	Zisk	9	20,45	3	6,82
	Delece	3	6,82	3	6,82
3	Zisk	3	6,82	5	11,36
	Delece	5	11,36	3	6,82
4	Zisk	5	11,36	2	4,55
	Delece	4	9,09	9	20,45
5	Zisk	5	11,36	0	0,00
	Delece	1	2,27	4	9,09
6	Zisk	7	15,91	5	11,36
	Delece	1	2,27	3	6,82
7	Zisk	4	9,09	10	22,73
	Delece	11	25,00	3	6,82
8	Zisk	7	15,91	8	18,18
	Delece	2	4,55	1	2,27
9	Zisk	3	6,82	5	11,36
	Delece	4	9,09	5	11,36
10	Zisk	1	2,27	5	11,36
	Delece	3	6,82	3	6,82
11	Zisk	1	2,27	3	6,82
	Delece	9	20,45	6	13,64
12	Zisk	9	20,45	10	22,73
	Delece	3	6,82	1	2,27
13	Zisk	0	0,00	7	15,91
	Delece	0	0,00	6	13,64
14	Zisk	0	0,00	3	6,82
	Delece	0	0,00	9	20,45

15	Zisk	0	0,00	4	9,09
	Delece	0	0,00	4	9,09
16	Zisk	5	11,36	2	4,55
	Delece	9	20,45	11	25,00
17	Zisk	0	0,00	8	18,18
	Delece	8	18,18	14	31,82
18	Zisk	3	6,82	3	6,82
	Delece	3	6,82	4	9,09
19	Zisk	1	2,27	3	6,82
	Delece	4	9,09	2	4,55
20	Zisk	2	4,55	6	13,64
	Delece	3	6,82	1	2,27
21	Zisk	0	0,00	3	6,82
	Delece	0	0,00	5	11,36
22	Zisk	0	0,00	7	15,91
	Delece	0	0,00	11	25,00
X	Zisk	6	13,64	13	29,55
	Delece	5	11,36	5	11,36



Graf 7: Grafické znázornění všech změn nalezených u 44 pacientů

Na vodorovné ose jsou uvedeny oblasti chromozomů (krátká raménka – p a dlouhá raménka – q), na svislé ose relativní četnosti (v %). Zeleně jsou znázorněny zisky a červeně delece. Tmavším odstínem barvy jsou odlišena krátká raménka.

Tab. 26: Asociace s věkem v době diagnózy

V tabulce jsou uvedeny výsledné *p* - hodnoty pro asociaci delecí a zisků všech chromozomů s věkem pacienta v době diagnózy. Zeleně jsou zvýrazněny změny, u kterých vyšla statisticky významná závislost.

Chromozom	p - hodnota			
	Krátké raménko (p)		Dlouhé raménko (q)	
	Zisk	Delece	Zisk	Delece
1	X	0,753	0,375	0,595
2	0,160	0,087	1,000	0,725
3	0,299	0,311	0,641	0,792
4	0,886	0,261	1,000	0,665
5	0,641	1,000	X	0,679
6	0,374	0,414	0,622	0,069
7	0,119	0,003	0,160	0,256
8	0,660	0,152	0,988	1,000
9	0,345	0,465	0,143	1,000
10	1,000	0,321	0,517	0,069
11	1,000	0,587	0,692	0,083
12	0,793	0,692	0,979	1,000
13	X	X	0,216	0,514
14	X	1,000	0,104	0,606
15	X	X	0,768	0,256
16	0,802	0,747	0,647	0,248
17	1,000	0,870	0,548	0,979
18	0,258	0,321	0,258	0,165
19	1,000	0,953	0,476	0,330
20	0,888	0,965	0,880	1,000
21	X	X	0,692	0,590
22	X	X	0,802	0,020
X	0,605	0,223	0,899	0,228

Tab. 27: Asociace s pohlavím

V tabulce jsou uvedeny výsledné p - hodnoty pro asociaci delecí a zisků všech chromozomů s pohlavím pacienta. Zeleně jsou zvýrazněny změny, pro které vyšla statisticky významná závislost.

Chromozom	p - hodnota			
	Krátké raménko (p)		Dlouhé raménko (q)	
	Zisk	Delece	Zisk	Delece
1	X	1	1	0,614
2	0,734	0,239	0,455	1
3	1	1	1	0,086
4	0,356	0,356	1	0,71
5	0,356	1	X	0,614
6	1	0,493	0,316	0,086
7	0,614	0,294	0,734	0,316
8	0,217	1	0,436	1
9	0,583	0,614	0,646	0,356
10	0,455	1	0,646	1
11	0,455	0,471	0,239	0,614
12	0,472	1	0,509	1
13	X	X	1	0,025
14	X	0,455	0,493	0,477
15	X	X	1	1
16	0,646	0,356	1	1
17	0,455	0,71	0,71	1
18	1	0,583	1	0,316
19	0,455	0,614	0,583	0,493
20	1	1	1	1
21	X	X	0,086	1
22	X	X	1	0,0445
X	1	1	0,009	0,011

Tab. 28: Asociace s histologickým typem nádoru

V tabulce jsou uvedeny výsledné p - hodnoty pro asociaci delecí a zisků všech chromozomů s histologickým typem nefroblastomů. Zeleně jsou zvýrazněny změny, pro které vyšla statisticky významná závislost.

Chromozom	p - hodnota			
	Krátké raménko (p)		Dlouhé raménko (q)	
	Zisk	Delece	Zisk	Delece
1	X	0,535	0,959	0,809
2	0,222	0,389	0,377	0,107
3	0,422	0,231	0,177	0,800
4	0,087	0,759	0,377	0,897
5	0,759	0,377	X	0,256
6	0,540	0,489	0,292	0,337
7	0,109	0,851	0,994	0,292
8	0,703	0,647	0,373	0,885
9	0,800	0,658	0,736	0,759
10	0,885	0,935	0,705	0,918
11	0,904	0,807	0,107	0,292
12	0,994	0,800	0,827	0,377
13	X	X	0,916	0,296
14	X	0,904	0,993	0,155
15	X	X	0,292	0,109
16	0,298	0,705	0,605	0,737
17	0,885	0,076	0,102	0,006
18	0,383	0,102	0,383	0,787
19	0,885	0,256	0,935	0,507
20	0,165	0,422	0,905	0,904
21	X	X	0,800	0,659
22	X	X	0,935	0,007
X	0,416	0,099	0,973	0,916

Tab. 29: Asociace se stádiem onemocnění

V tabulce jsou uvedeny výsledné p - hodnoty pro asociaci delecí a zisků všech chromozomů se stádiem onemocnění. Statisticky významná asociace nevyšla pro žádnou změnu.

Chromozom	p - hodnota			
	Krátké raménko (p)		Dlouhé raménko (q)	
	Zisk	Delece	Zisk	Delece
1	X	0,419	0,094	0,340
2	0,962	0,944	0,919	0,408
3	0,478	0,169	0,320	0,944
4	0,221	0,764	0,919	0,401
5	0,256	0,919	X	0,340
6	0,583	0,948	0,073	0,944
7	0,779	0,359	0,452	0,469
8	0,591	0,248	0,554	0,919
9	0,105	0,340	0,560	0,764
10	0,919	0,633	0,481	0,944
11	0,234	0,366	0,944	0,752
12	0,243	0,470	0,419	0,919
13	X	X	0,458	0,817
14	X	0,234	0,948	0,218
15	X	X	0,779	0,086
16	0,206	0,672	0,948	0,702
17	0,919	0,873	0,587	0,291
18	0,408	0,944	0,408	0,779
19	0,919	0,291	0,314	0,699
20	0,188	0,478	0,637	0,625
21	X	X	0,609	0,791
22	X	X	0,838	0,464
X	0,724	0,840	0,512	0,537

Tab. 30: Shoda MLPA a SNP array u všech vzorků

V tabulce je uvedeno, u kterých změn se jednotlivé vzorky shodovaly a u kterých ne. Poslední sloupec udává, u kterých vzorků se obě metody shodovaly ve všech pozorovaných změnách.

Číslo vzorku	Shoda							Celková shoda
	Delece 1p	Zisk 1q	Zisk NMYC	Delece WT1	Delece 16q	Delece 17p (TP53)	Delece WTX	
1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
4	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
5	ne	ano	ne	ano	ano	ano	ne	NE
6	ano	ne	ano	ano	ne	ano	ano	NE
7	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
8	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
9	ano	ano	ne	ano	ano	ano	ano	NE
10	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
11	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
12	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
13	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
14	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
15	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
16	ano	ne	ano	ano	ano	ano	ano	NE
17	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
18	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
19	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
20	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
21	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
22	ano	ano	ano	ano	ne	ano	ano	NE
23	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
24	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
25	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
26	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
27	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
28	ano	ano	ano	ne	ano	ano	ano	NE
29	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
30	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
31	ano	ne	ano	ano	ano	ano	ano	NE
32	ano	ano	ne	ano	ano	ano	ano	NE
33	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
34	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
35	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
36	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO

37	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
38	ano	ano	ano	ano	ne	ano	ano	NE
39	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
40	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
41	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
42	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
43	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
44	ano	ano	ne	ano	ano	ano	ano	NE
45	ne	ano	ano	ano	ano	ano	ano	NE
46	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
47	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
48	ne	ano	ano	ano	ano	ano	ano	NE
49	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
50	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
51	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
52	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
53	ano	ne	ano	ano	ano	ano	ano	NE
54	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
55	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
56	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
57	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
58	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
59	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
60	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
61	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
62	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
63	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
64	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
65	ne	ano	ano	ano	ano	ano	ano	NE
66	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
67	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
68	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
69	ano	ne	ano	ano	ne	ano	ano	NE
70	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ne	ANO
71	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
72	ano	ano	ne	ano	ano	ne	ano	NE
73	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO
74	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ANO

