

Povoľujem zapožičanie mojej diplomovej práce ku študijným účelom a prosím, aby bola vedená presná evidencia vypožičiavateľov. Prevzaté údaje je vypožičiavateľ povinný riadne citovať.

Univerzita Karlova v Praze
Prírodovedecká fakulta

Biológia
Genetika, molekulárna biológia a virológia



Bc. Božidara Hrindová

Dôkaz somatických mutácií významných pre neuroektodermálne nádory

(*CTNNB1*, *BRAF*, *ALK*)

Verification of somatic mutations important for neuroectodermal tumors

(*CTNNB1*, *BRAF*, *ALK*)

Diplomová práca

Vedúci záverečnej práce: MUDr. Aleš Vícha, Ph.D.

Praha, 2015

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 14.08.2015

.....

Podpis

Podakovanie:

V prvom rade by som chcela poďakovať môjmu školiteľovi MUDr. Alešovi Víchovi, Ph.D., pod ktorého vedením som túto prácu vypracovávala, za jeho vedenie, trpezlivosť, rady a pomoc, ktorú mi poskytol počas doby písania. Ďakujem tiež pracovníkom laboratória na Klinike detskej hematológie a onkológie UK 2. LF a FN Motol za pomoc pri vykonávaní praktickej časti práce. Veľká vďaka patrí mojim rodičom za podporu a trpezlivosť počas celej doby štúdia.

Abstrakt

Diplomová práca bola zameraná na dôkaz vybraných somatických mutácií u génov *ALK* (Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase), *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) a *β-katenín* (*CTNNB1*) prostredníctvom molekulárno - genetických metód v cieľovej skupine neuroektodermálnych nádorov (neuroblastóm, meduloblastóm, nádory mozgu, paragangliom a feochromocytóm). Niektoré z nich sú už považované za prognostické ukazovatele, ktoré napomáhajú určiť podtyp jednotlivých malignít a na základe tejto molekulárno – biologickej klasifikácie výber správnej liečby. Pre analýzu bol použitý genetický materiál od 133 pacientov, rozdelený podľa typu nádorového ochorenia. Prítomnosť mutácie bola detegovaná v siedmych prípadoch, z čoho 2 prislúchali génu *BRAF*, 1 génu *ALK* a 4 génu *β-katenín*. U jednotlivých génov boli predmetom skúmania hotspotové mutačné miesta, pričom cieľom bolo potvrdiť prítomnosť mutácií v nich a prispieť tým k štúdiám zameraným na zavedenie vhodnejšej liečby pomocou inhibítorov mutovaných génov.

Kľúčové slová: *ALK*, *BRAF*, *β-katenín* (*CTNNB1*), neuroektodermálne nádory, sekvenácia, MLPA

Abstract

The diploma thesis was focused on evidence of selected somatic mutations in genes *ALK* (Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase), *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) and *β-catenin* (*CTNNB1*) through molecular - genetic methods in the target group of neuroectodermal tumors (neuroblastoma, medulloblastoma, brain tumors, paraganglioma and pheochromocytoma). Some of them are already considered as prognostic indicators which help to identify the subtype of various tumors and on the basis of this molecular - biological classification choosing the appropriate treatment. The genetic material of 133 patients was used for the analysis divided by the type of cancer. The presence of the mutation was detected in seven cases, of which two of them belonged to the gene *BRAF*, one to the gene *ALK* and four to the gene *β-catenin*. The subject of research in the cases of this genes were hotspot mutation sites. The purpose was to confirm the presence of the mutation in the hotspots and contribute to the studies which are aimed at the introduction of more suitable treatment through the inhibitors of mutated genes.

Keywords: *ALK*, *BRAF*, *β-catenin* (*CTNNB1*), neuroectodermal tumors, sequencing, MLPA

Obsah

1. Zoznam skratiek	7
2. Úvod	8
3. Ciele práce	10
Hypotézy	10
4. Prehľad literatúry	11
4.1. Nádory	11
4.2. Nádory CNS u detí a mladistvých	11
4.2.1 Gliómy	13
4.2.1.1. Astrocytóm	14
4.2.2 Embryonálne nádory	15
4.2.2.1. Meduloblastóm	15
4.2.3 Neuroblastóm	17
4.2.4 Feochromocytóm	18
4.3. Študované gény	19
4.3.1 β -katenín (CTNNB1)	19
4.3.1.1. Wnt/ β -katenín signálna dráha	21
4.3.1.2. β -katenín a nádorové ochorenia	23
4.3.2 BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)	25
4.3.2.1. MAPK/ERK signálna dráha	26
4.3.2.2. BRAF a ochorenia	28
4.3.3 ALK (Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase)	30
4.3.3.1. ALK a nádorové ochorenia	32
4.3.3.2. ALK a neuroblastóm	33
5. Materiál a metódy	35
5.1. Materiál použitý na analýzu	35
5.2. Izolácia DNA z tkanív (Purgene)	36
5.3. Sekvenovanie	37
5.3.1 PCR reakcia	37
5.3.2 Elektroforéza	38
5.3.3 Sekvenačná PCR	39
5.3.4 Čistenie po sekvenačnej PCR	40
5.3.5 Príprava vzorky na fragmentačnú analýzu	41
5.3.6 Kapilárna elektroforéza a analýza	41
5.4. MLPA	41
5.4.1 DNA denaturácia a hybridizácia Salsa prób (1. deň)	41
5.4.2 Ligačná reakcia (2. deň)	42

5.4.3 PCR reakcia (2. deň)	43
5.4.4 Príprava vzorky na fragmentačnú analýzu (2. deň).....	43
5.4.5 Kapilárna elektroforéza a analýza	44
6. Výsledky.....	45
6.1. Detekcia mutácie BRAF génu.....	45
6.1.1 Pacienti s neuroblastómom	46
6.1.2 Pacienti s meduloblastómom.....	47
6.1.3 Pacienti s feochromocytómom.....	49
6.1.4 Pacienti s nádorom mozgu	50
6.2. Detekcia mutácie ALK génu sekvenovaním	52
6.3. Detekcia mutácie génu β -katenín sekvenovaním.....	54
7. Diskusia	57
8. Súhrn	64
9. Literatúra.....	65

1. Zoznam skratiek

ALK	Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CDK	cyklín dependentná kináza (cyclin dependent kinase)
CK1	kazeín kináza 1 (Casein Kinase 1)
CNS	centrálna nervová sústava
DSH	Dishewelled
EGF	epidermálny rastový faktor (Epidermal Growth Factor)
EtBr	ethidium bromid
EtOH	etanol
EX	exón
FP	priamy <i>primer</i> (Forward Primer)
F	žena (Female)
FAP	familiárna adenomatózna polypóza (Familial Adenomatous Polyposis)
FEO	feochromocytóm
FGF	fibroblastový rastový faktor (Fibroblast Growth Factor)
FISH	fluorescenčná in situ hybridizácia (Fluorescence In Situ Hybridisation)
Fz	Frizzled
GSK3	glykogén syntáza kináza 3 (Glycogen Synthase Kinase 3)
HDAC	histondeacetyláza
HR	nádor vysokého rizika (High Risk)
IDH	Isocitrate Dehydrogenase
INSS	The International Neuroblastoma Staging System
LOH	strata heterozygoty (Loss of Heterozygosity)
LR	nádor nízkeho rizika (Low Risk)
M	muž (male)
MAPK	mitózu aktivujúca proteín kináza (Mitotic Activated Protein Kinase)
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MEN	syndróm endokrinnnej neoplázie (Multiple Endocrine Neoplasie)
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MYCN	V-Myc Avian Myelomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma
NaOAc	acetát sodný
NF1	neurofibromin 1
NSCLC	nemalobunečný karcinóm pľúc (Non-small Cell Lung Cancer)
PARA	paragangliom
PDGF	Platelet-Derivate Growth Factor
PNET	primitívny neuroektodermálny nádor (primitive neuroectodermal tumor)
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTCH	Patched 1
RP	reverzný <i>primer</i> (Reverse Primer)
RAS	Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
Rb	retinoblastoma
RTK	receptor tyrozín kináza (Receptor Tyrosin Kinase)
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SH3	Src homológna doména 3 (Src homology-3)
SHH	Sonic Hedgehog signálna dráha
SR	nádor stredného rizika (Standard Risk)
TP53	tumor proteín p53 (tumor protein p53)
VEGF	vaskulárny endoteliálny rastový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)
VHL	Von Hippel-Lindau syndróm
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia (World Health Organization)
WNT	signálna dráha Wingless Integration

2. Úvod

Vznik zhubného nádorového ochorenia je dôsledkom narušenia kontroly delenia, prežívania a rastu buniek. Jednou z hlavných príčin tumorgenézy (malígnej transformácie buniek) sú somatické mutácie génov, ktoré kódujú rastové faktory a proteín kinázy. Produkty týchto génov sú súčasťou základných signálnych dráh zabezpečujúcich reguláciu životne dôležitých bunkových procesov a zmenami na úrovni DNA (mutáciami) dochádza k narušeniu stabilných funkcií. Mnohé zo zmien u týchto génov sú špecifické pre konkrétne typy malignít a stali sa ich prognostickými ukazovateľmi.

Táto práca je zameraná na nádory vzniknuté z neuroektodermy, konkrétne neuroblastóm, meduloblastóm, nádory mozgu a feochromocytóm. Cieľom záujmu boli 3 gény, konkrétne detekcia a dôkaz vybraných somatických mutácií v génoch *ALK*, *BRAF* a *β -katenín*.

ALK gén (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase) kóduje produkt, ktorý patrí do skupiny tyrozín kináz, konkrétne podskupiny inzulínových receptorov. Kódovaný proteín vykazuje tkanivovo špecifickú expresiu a to predovšetkým v mozgu, ale tiež v čreve a semenníkoch. Výrazne teda ovplyvňuje procesy spojené s vývojom mozgu a špecifických neurónov v nervovej sústave. V spojitosti s neuroblastómom boli detegované chromozómové prestavby, konkrétne translokácie *ALK* génu s rôznymi fúznymi partnermi, ktoré následne viedli k overexpresii. Častejšie sa však objavili bodové mutácie a amplifikácie. Zaujímavé bolo zistenie, že prítomná amplifikácia *ALK* génu u neuroblastómov je väčšinou asociovaná s amplifikáciou *MYCN* onkogénu, s ktorým leží na krátkom ramienku chromozómu dva (Ambros a kol. 2009). Výskyt tejto spoločnej amplifikácie bol detegovaný u vysoko rizikovej skupiny pacientov a je považovaná za identifikačný znak tejto skupiny. V prípade sporadického neuroblastómu boli mutácie *ALK* génu preukázané s incidenciou 6 – 12 % (Greengard a kol. 2010).

Ďalší z génov asociovaných s tumorigenézou je gén *BRAF* (v-raf murin sarcoma viral oncogene homolog B1). Kóduje proteín z početnej rodiny raf serin/threoninových kináz, ktorý zohráva dôležitú úlohu v regulácii signálnej dráhy MAPK/ERK ovplyvňujúcu bunkové delenie, diferenciáciu, sekréciu a apoptózu. *Missense* mutácie v tomto géne sa vyskytujú v rôznych typoch nádorových ochorení,

akými sú predovšetkým malígnym melanóm (až 66 %), ale tiež v malom percente kolorektálneho karcinómu, karcinómu pľúc a iných. Najčastejšie sa vyskytujúcou mutáciou, z vyše 40-tich objavených, je transverzia v exóne 16 v kodóne 600 (V600E), ktorá zamieňa valín za kyselinu glutámovú, čím prepožičiava bunkám transformačnú aktivitu. Takto je zabezpečený permanentne aktívny stav proteínu B-raf, teda zvýšená kinázová aktivita a to nezávisle na signalizácii RAS proteínu (Davies a kol. 2002). Hoci u melanómu sa mutácia *BRAF* génu vyskytuje pomerne často, u neuroblastómu bola naopak pozorovaná len v 1 % pacientov, aj keď sú oba nádory neuroektodermálneho pôvodu (Shukla a kol. 2011). Napriek nízkej incidencii sa však predpokladá vplyv mutácie V600E génu *BRAF* na malignitu tohto ochorenia. V prípade meduloblastómu je v spojitosti s génom *BRAF* málo informácií a u feochromocytómu zatiaľ žiadne. Nedá sa ale ani v týchto prípadoch vylúčiť výskyt niektorej z *BRAF* mutácií.

CTNNB1 gén (β -katenín) kóduje aktivátor a transkripčný regulátor β -katenín, ktorý zohráva dôležitú úlohu v adhézii buniek, medzibunkovej komunikácii a je súčasťou Wnt signálnej dráhy nevyhnutnej pre správny priebeh prenatálneho vývoja. β -katenín patrí medzi protoonkogény a jeho aktivačné mutácie sú asociované so vznikom viacerých typov malignít. Vysokou incidenciou takýchto mutácií sa vyznačuje kolorektálny karcinóm (Huang a kol. 2000), o niečo menej častý výskyt je v prípade hepatoblastómu, nádorov vaječníkov a prostaty. Prítomnosť *missense* mutácie bola detekovaná aj v prípade sporadického meduloblastómu. Štúdiá uvádzajú incidenciu mutácie v géne *CTNNB1* 8,7 % (Huang a kol. 2000). Zaujímavé je, že mutácie *CTNNB1* sa vyskytujú spoločne s deléciou celého chromozómu 6 a spoločne sa ukazujú ako prognostické ukazovatele pre Wnt skupinu pacientov s predpokladom veľmi dobrej prognózy na prežitie (Fattet a kol. 2009). U neuroblastómu a feochromocytómu zatiaľ prítomnosť mutácie v géne pre β -katenin nebola preukázaná. Avšak rovnako, ako pri ostatných génoch, sa predpokladá možný výskyt z dôvodu neuroektodermálneho pôvodu.

Diplomová práca je zameraná na dôkaz mutácií uvedených génov v prípade vybraných neuroektodermálnych nádorov. U neuroblastómu a u meduloblastómu už prítomnosť niektorých týchto mutácií bola dokázaná a zaraďujú sa medzi prognostické faktory ich molekulárne – biologickej klasifikácie. Práca mala overiť alebo zistiť prítomnosť spomínaných mutácií a prispieť tak k zavedeniu vhodnejšej liečby prostredníctvom inhibítorov mutovaných génov.

3. Ciele práce

- Prostredníctvom molekulárno – genetických metód sledovať zmeny na úrovni DNA u vybraných 3 génov v bunkách, získaných izoláciou z tkanív neuroektodermálnych nádorov (meduloblastóm, neuroblastóm, feochromocytóm, nádory mozgu).
- U feochromocytómu zistiť prítomnosť mutácie V600E génu *BRAF*, ktorá doposiaľ nebola detegovaná.
- U meduloblastómu potvrdiť prítomnosť mutácie β -*katénínu* s prítomnosťou delécie celého chromozómu 6, a zároveň zistiť prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF*.
- U neuroblastómu potvrdiť prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF*, zistiť mutácie v exonoch 23 a 25 v géne *ALK*.
- U nádorov mozgu zistiť prítomnosť mutácie v géne *BRAF*.
- Preukázať incidenciu mutácií u vybraných nádorov, u meduloblastómu a neuroblastómu porovnať výsledky s klinickými dátami a molekulárno – genetickými prognostickými znakmi.

Hypotézy

- U feochromocytómu predpokladám prítomnosť mutácie génu *BRAF*.
- U meduloblastómu predpokladám prítomnosť mutácie β -*katénínu*, a zároveň delécie celého chromozómu 6.
- U neuroektodermálnych nádorov predpokladám prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF* a mutácie v exonoch 23 a 25 v géne *ALK*.
- U neuroblastómu predpokladám prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF*.

4. Prehľad literatúry

4.1. Nádory

Ľudský organizmus je tvorený veľkým množstvom buniek, líšiacich sa svojou veľkosťou, tvarom aj funkciou. Zdravé bunky podliehajú prísny reguláčnym mechanizmom, ktoré regulujú ich proliferáciu. Ak dôjde k poruche regulačného systému, naruší sa aj správna bunková proliferácia. Výsledkom nekontrolovaného delenia je vznik nádoru – súboru abnormálnych buniek.

Nádorové ochorenia rozdeľujeme na 2 základné skupiny, a to, benígne, tzv. nezhubné a malígne, tzv. zhubné. Benígne nádory sú oveľa častejšie ako malígne nádory. Vyznačujú sa pomalým rastom buniek. Bunky sú zrelšie a podobajú sa na bunky, z ktorých sú vyvinuté. Bunky benígneho nádoru neinfiltrujú okolité tkanivo a nešíria sa do iných častí tela (nemetastázujú). Oproti tomu malígne nádory sú charakteristické rýchlym a nekontrolovateľným rastom, schopnosťou infiltrácie, a metastázovaním.

Podľa miesta vzniku rozlišujeme dve formy nádorov, a to solídne (pevné), ktoré môžu vznikať z buniek a tkanív rôznych orgánov (Stephens a Aigner 2009). Opakom solídnych nádorov sú leukémie, ktoré netvoria pevnú hmotu. Je to zhubné nádorové ochorenie, ktoré postihuje krvotvorné tkanivo ako je kostná dreň. Spôsobí vznik abnormálnych krvných buniek, ktoré majú narušený proces dozrievania a diferenciácie a tým sa naruší správna krvotvorba.

Častým mechanizmom tvorby zhubného nádoru je vznik mutácií v regulačných génoch, medzi ktoré patria protoonkogény, tumor supresorové gény a mutátorové gény. Dôsledkom týchto mutácií sú zmeny na úrovni DNA, pričom v prípade protoonkogénov hovoríme o aktivačných mutáciách, u tumor supresorových ide o inaktivačné mutácie a u mutátorových génov o mutácie spôsobujúce narušenie funkcie. Vznik zhubného ochorenia je potom väčšinou výsledkom spolupôsobenia viacerých zmien v týchto génoch (Nussbaum a kol. 2004).

4.2. Nádory CNS u detí a mladistvých

Nádory centrálnej nervovej sústavy (CNS) predstavujú najčastejšie sa vyskytujúce solídne nádory u detí, až 20 %, a u dospievajúcich približne 9 – 10 %

(Churáčková 2008). Sú druhou najčastejšou príčinou úmrtia detí do 15 rokov po úraze. Výskyt významne závisí od veku. Najväčšia incidencia je do veku 4 rokov (3,1/100 000/rok), najnižšia vo veku medzi 15 – 24 rokov (1,8/100 000/rok). Konkrétne typy nádorov sú tiež charakteristicky späté s určitými vekovými kategóriami (Nevšímalová a kol. 2002). Približne 8 % všetkých malignít diagnostikovaných u detských pacientov mladších ako 15 rokov predstavuje neuroblastóm, ktorý je zodpovedný za neprimerané percento detských úmrtí na rakovinu, približne 15 % (Brodeur a Castleberry 1997). Až 90 % nádorov CNS u detí je intrakraniálnych (postihujúcich mozog), pričom 55 % z nich je infratentoriálnych (oblasť mozočku a mozgového kmeňu). 10% nádorov CNS je infraspinálnych, teda postihujúcich miechu (Churáčková 2008). Vznikajú buď sekundárne alebo primárne. Sekundárne ako dôsledok metastatickej aktivity nádoru z iného orgánu alebo tkaniva – to je ale u detí, na rozdiel od dospelých, vzácné a deje sa to prevažne až pri pokročilejších štádiách ochorenia. Primárne sú výsledkom nádorového bujnenia rôznych tkanív nervového systému. Veľká časť z nich je pritom benígna, neexpanduje do okolitých tkanív, ostáva v mieste vzniku a po chirurgickom odstránení už nerecidivujú (Nevšímalová a kol. 2002).

Základné nádorové rozdelenie na benígne a malígne je ale v prípade týchto tumorov relatívne. Nádory CNS tvoria heterológnu skupinu z hľadiska pôvodu. S tým súvisí fakt, že nie vždy platí, že benígny nádor nie je invazívny, pretože sa môže stať kvôli svojej lokalizácii neprístupným pre chirurgické odstránenie. Z tohto dôvodu sa nádory CNS klasifikujú na základe bunkového pôvodu a stupňa malignity podľa najnovšej verzie Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) z roku 2007 (Obrázok č.1). Táto klasifikácia je považovaná za štandard pre definíciu mozgových nádorov v klinickej onkológii (Louis a kol. 2007).

I. Nádory neuroglie (gliomy)	VI. Nádory z nervových pošiev
astrocytóm	Schwannóm (neurilemmóm)
oligodendroglióm	neurofibróm
ependymóm	maligný nádor z nervových obalov
papilóm plexus chorioideus	VII. Iné primárne vnútroparenchýmové nádory
II. Nádory neurónov	hemangioblastóm
neuroblastóm	primárny lymfóm CNS
ganglioneuroblastóm	nádory zo zárodkových buniek
ganglioneuróm	VIII. Rôznorodé nádory
III. Nádory neurónov a neuroglie	malígny melanóm
ganglioglióm	kraniofaryngióm
IV. Slabo - diferencované a embryové nádory	nádory z buniek corpus pineale
meduloblastóm	nádory z hypofýzy
neuroblastóm	IX. Nádorom podobné zmeny
PNET	epidermová cysta, dermoidná cysta, koloidná cysta)
V. Nádory meningov	X. Metastazujúce nádory
meningióm	
sarkóm meningov	

Obrázok č.1: Klasifikácia nádorov CNS podľa WHO z roku 2007.

4.2.1 Gliómy

Najčastejšie primárne nádory CNS, ktoré pochádzajú z gliových buniek, presnejšie z neuroektodermy sú gliómy. Zapríčiňujú až 40% lebečných nádorov (štatistický údaj: CBTRUS 2004:1-51, Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 1997-2001. Published by the Central Brain Tumor Registry of the United) a do tejto skupiny patrí:

- Astrocytóm
- Oligodendrocytóm
- Ependimón
- Nádory chorioidálneho plexu

e) Xantoastrocytóm

f) Gangliogliom

Gliómy sú charakteristické tým, že nie sú dobre ohraničené a prenikajú do susedných tkanív, a však len málo mimo CNS (Louis a kol. 2001).

4.2.1.1. Astrocytóm

Vzniká z astrocytárnych buniek a predstavuje najvariabilnejšiu skupinu neuroektodermálnych nádorov. Astrocytómy rozdeľujeme na difúzne a ohraničené (menej časté).

Difúzne infiltrujú mozgové tkanivo a vyskytujú sa predovšetkým u dospelých jedincov (Nevšimalová a kol. 2002). Vyskytuje sa hlavne v mozgových hemisférach, u detí postihuje hlavne mozoček, mozgový kmeň a optický nerv (infratentoriálny výskyt). Vyznačuje sa viacerými stupňami malignity a podľa WHO klasifikácie z roku 2007 sa delia do 4 štádií (*gradov*) podľa zvýšenej mitotickej aktivity, proliferácie a nekrotických zmien. I. a II. stupeň sú označované ako benígne astrocytómy, III. a IV. stupeň ako malígne. IV. stupeň je považovaný za najhorší a najagresívnejší primárny nádor vychádzajúci z mozgového tkaniva a zároveň najčastejší u dospelých.

Najčastejšou molekulárnou príčinou vzniku sa ukazuje mutácia tumor-supresorového génu *TP53*. V prípade primárnych astrocytómov boli preukázané viaceré chromozómové aberácie, ako delécie 9p, 11p, 13q, 17p, 22q. Konkrétne stupeň I je spätý s mutáciou génu *NF1* na krátkom ramienku chromozómu 17. Stupeň II sprevádzajú mutácie génov *p53*, *PDGF*, *FGF*, *EGF*, *VEGF* (Dreyfuss a kol. 2009). U III. stupňa astrocytómu pozorujeme deléciu 9p a 13q, a amplifikáciu *CDK-4*. IV. stupeň je charakteristický mutáciou tumor-supresorového génu *TP53*. LOH dlhého ramienka 10q23, na ktorom leží gén *PTEN* nachádzame u vyšších stupňoch astrocytómov. *PTEN* kóduje proteín, ktorý hrá dôležitú úlohu v angiogenéze, migrácii a invázii (Kleihues a kol. 2007).

Nedávne štúdie zistili zmeny v géne *BRAF*, ktoré sú považované za pôvodcu mutácii vedúcich k vzniku viacerých detských mozgových nádorov, vrátane astrocytómu (Dahiya a kol. 2012).

4.2.2 Embryonálne nádory

Embryonálne nádory vznikajú z nezrelých prekursorov neuronálnych a gliových buniek. Patrí sem:

- a) Meduloblastóm
- b) PNET – primitívny neuroektodermálny nádor (Louis a kol. 2007)

4.2.2.1. Meduloblastóm

Najčastejší primitívny neuroektodermálny nádor u detí – 25 % detských mozgových nádorov. Častejšie sa vyskytuje u chlapcov, pričom priemerný vek je 9 rokov (najčastejšie medzi 2-4 a 6-8 rokom) (Zitterbart a kol. 2010). Postihuje predovšetkým oblasť mozočku, odkiaľ vychádza a preniká do IV. mozgovej komory. Je schopný prenikať ako do lokálnych tkanív, tak do vzdialenejších oblastí, ako sú pľúca, kosti, pečeň. Zaraďuje sa medzi vysoko zhubné nádory (Nevšimalová a kol. 2002). Schopnosť metastázovania do iných, ako mozgových tkanív, sa spravidla vyskytuje až v posledných štádiách ochorenia. Podľa prognózy liečby sa rozlišujú dve skupiny pacientov s meduloblastómom – SR (standard risk) a HR (high risk).

Z molekulárne – genetického hľadiska boli v súvislosti s meduloblastómom dokázané určité chromozómové aberácie. Patria sem delécie 17p, izochromozóm 17q, amplifikácia *MYCN* a *MYCC*, monozómia 6 a zvýšená jadrová hladina β -katenínu (aktivácia dráhy Wnt/ β -catenín je znakom pozitívnej prognózy) (Pfister a kol. 2010). Podľa prítomnosti jednotlivých geneticko – molekulárnych markerov rozdeľujeme meduloblastómy do 4 skupín (Obrázok č. 2):

I. Wnt

- veľmi dobrá a dlhodobá prognóza (viac ako 90% šanca na dlhodobé prežitie)
- objavuje sa u starších detí
- mutácie *β -katenínu* vedú k zvýšeniu syntézy proteínov a bunkového cyklu (aktivácia Wnt signálnej dráhy)
- výskyt monozómie 6 (vynechanie jednej kópie chromozómu 6 v nádore)

II. SHH (Sonic Hedgehog signálna dráha)

- časté u detí a dospelých nad 16 rokov
- prognóza liečby je stredne dobrá
- mutácie génu *PTCH1* (kódujúci receptor PTCH)
- nádory identifikované na základe transkripčnej profilizácie

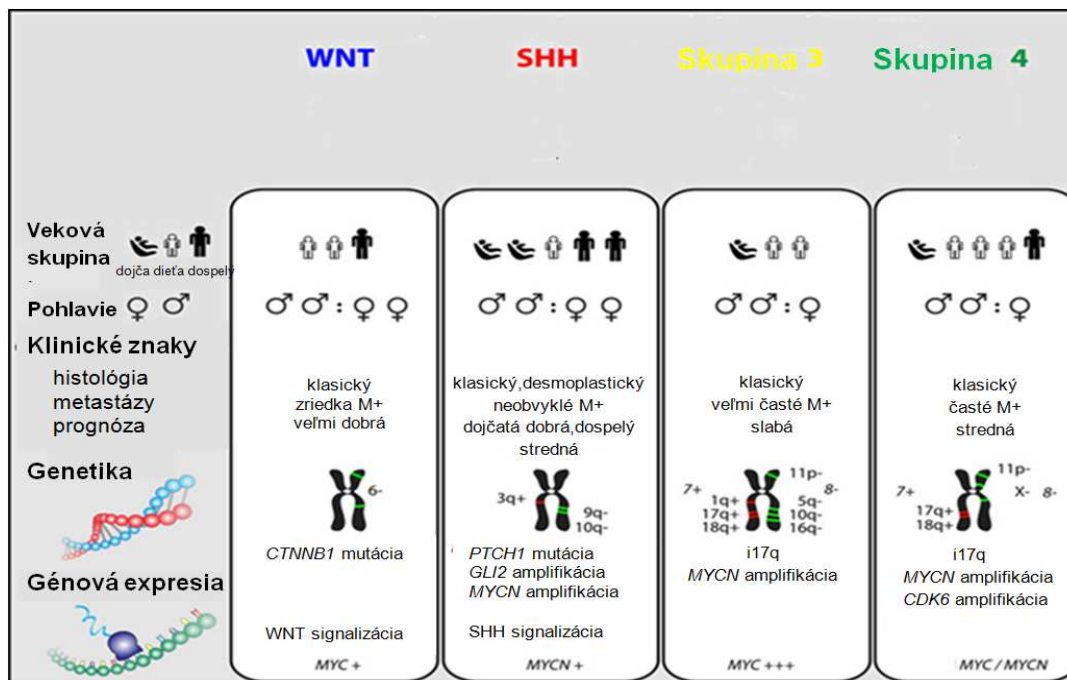
- vysoká hladina expresie *MYCN*
- delécia chromozómu 9 q zrejme obmedzená na SHH meduloblastómy (*PTCH1* gén sa nachádza na chromozóme 9q22)

III. skupina („klasický meduloblastóm“)

- väčšinou klasický histologický obraz meduloblastómu
- časté metastázy v čase stanovenia diagnózy
- zlá prognóza
- vysoká hladina expresie *MYC* (amplifikácia *MYC*)
- amplifikácia onkogénu *OTX2* (Orthodenticle Homeobox 2)
- amplifikácia 1q, 5q, 17q s/alebo bez isochromozómom 17q
- delécia 5q a 10q

IV. skupina

- predstavuje prototyp meduloblastómu: klasická histológia s isochromozómom 17q u 6-8 ročného chlapca
- molekulárna patogenéza nejasná
- isochromozóm 17q je tiež viditeľný v skupine 3 (26 %), ale je oveľa častejšie v skupine 4, kde je to najčastejšia pozorovaná cytogenetická zmena (66 %)
- 80 % žien s meduloblastómom skupiny 4 ukazuje deléciu pohlavného chromozómu X (Taylor a kol. 2011).



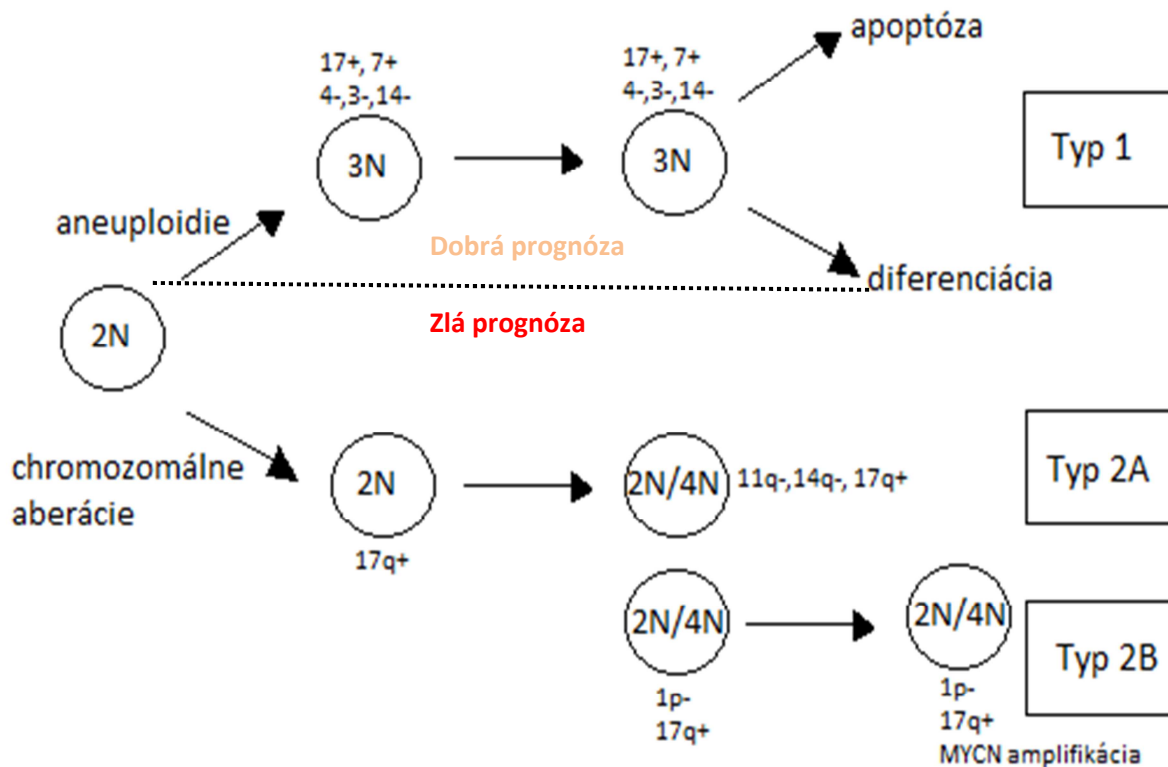
Obrázok č. 2: Rozdelenie meduloblastómov podľa geneticko-molekulárnych markerov (upravené podľa Taylor a kol. 2011).

4.2.3 Neuroblastóm

Neuroblastóm je vysoko maligný tumor periférálneho sympatického nervového systému. Po leukémiách a nádoroch mozgu je najčastejším nádorovým ochorením u detí. Asi 80 % detí je mladších ako 4 roky (Stephens a Aigner 2009). Neuroblastóm zapríčiňuje 15 % úmrtí detí v dôsledku nádorového ochorenia. Rozdiely sú porovnateľné hlavne vo vyšších štádiách ochorenia. Pravdepodobnosť celkového prežitia je až 88 % u detí (<18 mesiacov pri stanovení diagnózy). Títo pacienti majú veľmi dobrú prognózu, pričom v prípade preukázania delécie alebo zmnoženia celých chromozómov je pravdepodobnosť prežitia dokonca viac ako 95 % (Smith a kol. 2014). U detí, ktoré v dobe diagnostiky dosahujú vek 18 mesiacov - 12 rokov je to 49 %, a u dospievajúcich a mladých dospelých (≥ 12 rokov) iba 10 %. Väčšina mladých dospelých s diagnostikovaným neuroblastómom až v tomto veku má síce pravdepodobnosť prežitia nízku, ale priebeh ochorenia je pozvoľný a dlhodobý a preto je tento typ neuroblastómu tiež označovaný ako chronický (Cheung a kol. 2012).

U pacientov s neuroblastómom nachádzame rôzne výsledky v úspešnosti liečby v závislosti na rozsahu ochorenia (*staging*) a molekulárno - biologických prognostických znakov. Z molekulárno - biologického hľadiska sa rozlišujú 3 hlavné štádiá tohto nádorového ochorenia, pričom prvé dve sú charakteristické dobrou prognózou, vyššie, naopak, veľmi slabými výsledkami. Rovnako, ako pri predchádzajúcich nádoroch, aj pri neuroblastóme, sa jednotlivé štádiá vyznačujú genetickou podstatou. U nižších štádií nachádzame iba numerické chromozomálne aberácie, vyššie štádiá sú typické svojimi štrukturálnymi zmenami. Takouto zmenou je napríklad hemizygotná delécia chromozómu 1p36 alebo 11q, či naopak získanie (*gain*) 17q (Molenaar a kol. 2012). Typickou aberáciou, s výskytom u všetkých klinických štádií a vekových kategórií neuroblastómu, je amplifikácia protoonkogénu *MYCN*. Pacienti s amplifikáciou *MYCN* sú, až na výnimky, radení do biologickej skupiny vysokého rizika. Táto amplifikácia je spojená s rýchlou progresiou nádoru a zlou prognózou pre pacientov. Ukazuje sa, že s touto zmenou sú späté aj amplifikácie ďalších príbuzných génov, ako *DDX1* (DEAD Box Helicase 1) a *ALK*, pričom ich samotné amplifikácie bez *MYCN* sú zriedkavé (Ambros a kol. 2009). Klasifikácia neuroblastómu do 3 podskupín podľa prognózy na základe

preukázaných genetických zmien bola vytvorená Broderom v roku 1993 (Obrázok č. 3).



Obrázok č. 3: Klasifikácia neuroblastómu podľa Broudera (upravené podľa: Vícha a Eckschlager, 2008).

Preukázaná bola tiež prítomnosť mutácie génov *BRAF*, *RAS* a *MAP2K1*, ale len v prípade, že sa nevyskytovala mutácia *ALK*. V niekoľkých málo prípadoch sa objavili aj mutácie *CTNNB1* (β -catenin) (Shukla a kol. 2011). Vyskytuje sa podskupina pacientov 2N/4N vykazujúcich deléciu 11q a zisk 17q a deléciu 3p, na ktorom leží práve *CTNNB1*, ale bez amplifikácie *MYCN* (<http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/neurob5002.html>). U niektorých pacientov s vysokým štádiom neuroblastómu boli objavené lokálne rozkúskované chromozómy (tzv. *chromothripsis*). Nedávne štúdiá ukázali mutácie v géne *ATRX* u pacientov s vysokým štádiom neuroblastómu (Cheung a kol. 2012).

4.2.4 Feochromocytóm

Feochromocytóm patrí medzi neuroendokrinné nádory produkujúce katecholaminy. Feochromocytómy sa rozdeľujú na dve skupiny podľa časti neurálnej lišty z ktorej vznikli, pričom sa navzájom líšia genetickým základom, klinickými prejavmi aj prognózou. Prvou skupinou je klasický feochromocytóm (FEO), ktorý

vzniká a vyskytuje sa v nadobličkovej dreni. Druhú skupinu tvoria paragangliómy (PARA), vznikajúce zo sympatických a parasympatických ganglií a ich výskyt môže byť rôzny (oblasť brucha, hrudníka, krku, panvy) (Zelinka 2007) .

Väčšina FEO a PARA je benigných, no môže dôjsť k prítomnosti metastáz, a to v prípade pacientov so špecifickým genetickým obrazom (Brouwers a kol. 2006). Výskyt tohto typu tumoru je vzácny a väčšinou je spájaný s autozomálne dominantnými genetickými syndrómami Von Hippel-Lindau syndróm, neurofibromatóza typu 1, syndróm endokrinnnej neoplázie typu 2 (MEN2), familiárna paragangliomatóza a iné. Pacienti s týmito syndrómami majú mutácie v génoch, ktoré podporujú vznik neuroendokrinných nádorov (Opocher a Schiavi 2011). Najnovšie štúdie ukazujú, že 30-40 % FEO a PARA (Karásek a kol. 2012) majú dedičný charakter, pričom prvé tvrdenia uvádzali dedičný pôvod len u 10 % prípadov tohto typu tumoru (Neumann a kol. 2002). V prípade sporadického výskytu feochromocytómov (10-24 %) boli zistené somatické mutácie (Burnichon a kol. 2011, Welander a kol. 2012).

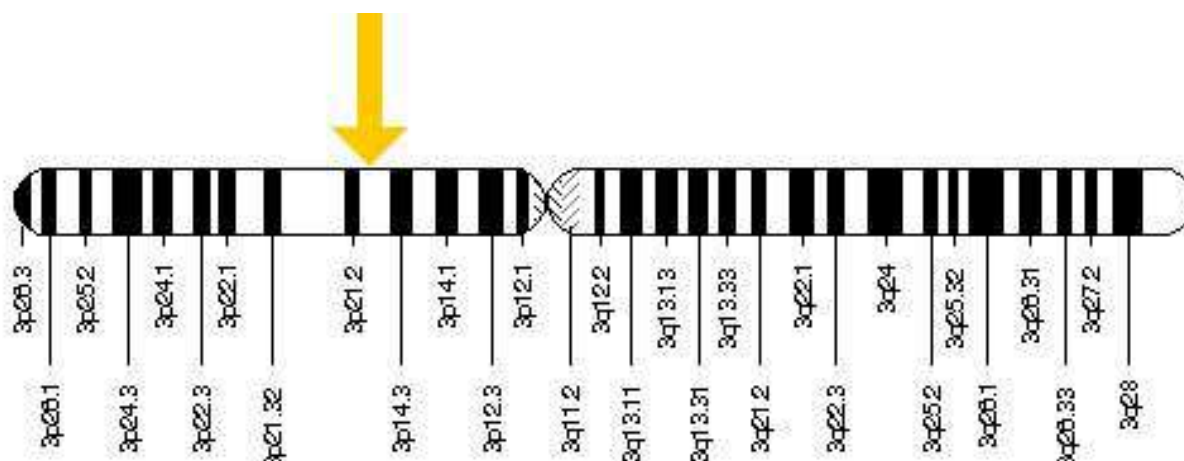
Doposiaľ bolo zistených 18 génov, ktoré sa podieľajú na vzniku feochromocytómov a paragangliómov. Jeden z najdôležitejších sa ukazuje tumor supresorový gén *VHL* a jeho zárodočné mutácie, ktoré sú príčinou vzniku syndrómu Von Hippel-Lindau. Ďalším génom, ktorého mutácie sú príčinou vzniku neurofibromatózy 1 a je často spájaný s výskytom feochromocytomu, je tumor supresor *NF1* (Vícha a kol. 2013). Aktivačná mutácia protoonkogénu *RET* sa vyskytuje u 50 % feochromocytómov a spôsobuje vznik syndrómu MEN2 (Opocher a Schiavi 2011). V prípade paragangliómu často nachádzame prítomnosť mutácie génov *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* a *SDHAF2*, čo sú gény kódujúce komplexné podjednotky sukcinát dehydrogenázy. Najnovšie štúdia zahŕňajú súvislosť medzi FEO/PARA a génmi *THEM127*, *MAX*, *HIF2A*, *KIF1Bβ*, *PHD2* / *EGLN1*, *H-RAS*, *K-RAS*, *IDH*, *FH*, a *BAP* (Jochmanova a kol. 2014).

4.3. Študované gény

4.3.1 β-katenín (CTNNB1)

Študovaný gén *CTNNB1*, leží na chromozóme 3p21 a má 17 exónov (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1499>). Konkrétne je lokalizovaný v rozpätí od

bázového páru 41,199,450 po bázový pár 41,240,447 na chromozóme 3 (Obrázok č. 4).



Obrázok č. 4: Lokalizácia génu *CTNNB1* na chromozóme 3 (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1>).

Gén *CTNNB1* kóduje proteín β -katenín, ktorého sekvenčný reťazec začína Methionínom, ako iniciátorom. Reťazec vlastného proteínu začína na pozícii 2, až po pozíciu 781, a teda dĺžka samotného proteínového reťazca je 780 aminokyselín. Sekundárnu štruktúru reťazca tvoria alfa helixy, 3 otáčky a 6 beta vlákna (http://www.uniprot.org/uniprot/P35222#section_seq).

Proteín, kódovaný génom *CTNNB1* (β -katenín) je z molekulárneho hľadiska je považovaný za aktivátora exprese niektorých génov, z biologického za dôležitý transkripčný regulátor. β -katenín je dôležitou súčasťou mnohých typov buniek a tkanív, v ktorých zohráva úlohu hlavne pri adhézii buniek a medzibunkovej komunikácii (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1>). Túto adhéznú funkciu vykonáva spolu s ďalšími proteínmi, s ktorými je súčasťou komplexu na vytváranie adhézných spojov. Kódovaný proteín tiež zabezpečuje ukotvenie aktínu cytoskeletu, čím môže dôjsť k prenosu inhibičného signálu medzi bunkami a tým zastaveniu bunkového delenia, keď je epiteliálny list kompletný (Peifer a kol. 1993).

Jednou z hlavných funkcií β -katenínu, je signalizácia. Je kľúčovou súčasťou signálnej dráhy Wnt, ktorá sa podieľa na podpore rastu, proliferácie a diferenciácie buniek. Signalizácia Wnt dráhy je dôležitá najmä v prenatálnom vývoji, v tkanivách dospelého jedinca zohráva údržbovú funkciu a zabezpečuje obnovu kmeňových buniek. β -katenín je po naviazaní niektorých proteínov, ktoré sú súčasťou Wnt signálnej dráhy, presúvaný do jadra, kde po interakcii s ďalšími proteínmi pôsobí ako transkripčný faktor a reguluje expresiu génov (<http://www.genecards.org/cgi->

bin/carddisp.pl?gene=CTNNB1&search=5a662dbe6689936ef25b9093cd9269fe podľa TOCRIS, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1>).

β -katenín má mnoho ďalších funkcií. Príkladom je jeho aktivita v bunkách vlasového folikulu, kde zabezpečuje jeho normálnu funkciu a tým správny rast a vývoj vlasov. Najnovšie štúdie dokonca ukazujú, že aktívny (nefosforylovaný) β -katenín je schopný vyvolať rast vlasov (Deschene a kol. 2014). Tento fakt dokazuje jeho schopnosť stimulovať proliferáciu.

β -katenín je v bunke lokalizovaný v cytoplazme, alebo v bunkovom jadre podľa stability proteínu. V prípade vysokej úrovne fosforylácie, alebo väzby na CDH1 je nestabilný a nachádza sa v cytoplazme. Keď sa zníži úroveň fosforylácie, dostáva sa do stabilného stavu a je translokovaný z cytoplazmy do jadra. Väčšina β -katenínu je lokalizovaná na bunkovej membráne ([http://www.uniprot.org/uniprot/P35222](http://www.uniprot.org/uniprot/P35222#section_seq) – subcellular location).

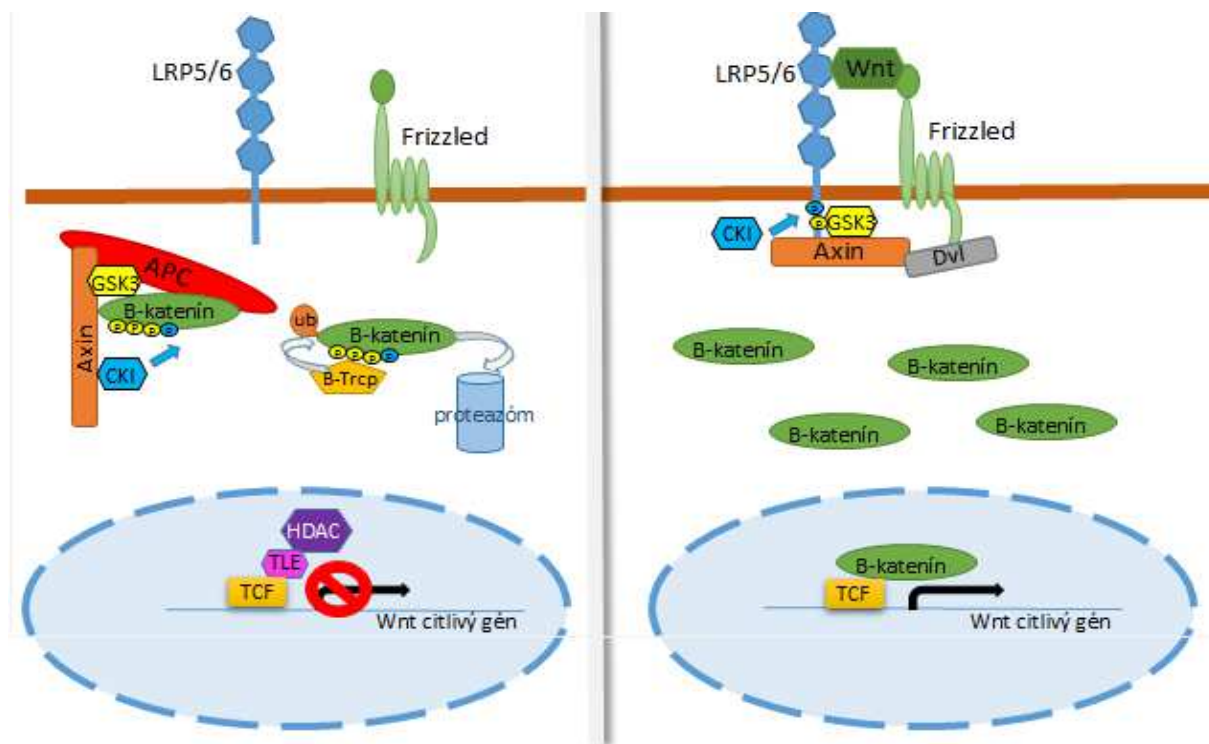
4.3.1.1. Wnt/ β -katenín signálna dráha

Wnt/ β -katenín kanonická signálna dráha riadi expresiu génov v jadre, ktoré sú kľúčové pre vývoj, proliferáciu a polaritu bunky a tkanivovú homeostázu (Logan a Nuss 2004). Spustenie signálnej dráhy je závislé od prítomnosti glykoproteínov Wnt rodiny na vonkajšej strane membrány.

V neprítomnosti Wnt ligandu je signálna dráha vypnutá, čo znamená, že β -katenín je v cytoplazme blokovaný. Blokovanie β -katenínu zabezpečuje komplex, ktorého je súčasťou a tvorí ho Axin proteín, APC (adenomatosis polyposis coli), CK1 (kazeín kináza 1) a GSK3 (glykogén syntáza kináza 3). CK1 a GSK3 postupne fosforylujú koncovú časť β -katenínu, ktorý je vďaka fosforylácii rozpoznávaný E3 ubiquitin ligázou β -Trcp. Tá ubiquitináciou β -katenínu určuje jeho prechod do proteazómu, v ktorom je β -katenín degradovaný (He a kol. 2004). Keďže dochádza k degradácii už v cytoplazme, expresia cieľových génov v jadre ostáva potláčaná komplexom TCF/LEF (DNA viažúci faktor T-buniek/lymfoidný enhancerový faktor) - TLE/HDAC (histondeacetyláza).

Wnt/ β -katenín signálna dráha je spustená v prítomnosti Wnt ligandu. Ten sa viaže na transmembránový receptor Frizzled (Fz) a jeho lipoproteínový ko-receptor LRP 5 alebo LRP 6. Vytvára sa tak komplex Wnt-LRP5/6-FZ a na Fz sa v cytoplazmatickej časti viaže ešte proteín Dishwelled (DSH). Vytvorením tohto

komplexu sa zabezpečí fosforylácia LRP5/6 pomocou CK1 a GSK3, čím sa uvoľní Axin z komplexu s β -katenínom a presúva sa na membránový receptorový komplex LRP-Fz. Rozrušením Axin komplexu nedochádza k degradácii (fosforylácii a ubiquitinácii) β -katenínu a ten sa v cytoplazme stabilizuje. Takto stabilizovaný β -katenín prechádza do jadra k cieľovým génom, kde sa viaže na TCF, slúži ako jeho ko-aktivátor a spúšťa expresiu Wnt cieľových génov (Obrázok č. 5) (MacDonald a kol. 2009).



Obrázok č. 5: GSK3 (glykogén syntáza kináza 3) a CK1 (kazeín kináza 1), ktoré sú súčasťou komplexu s Axin a APC (adenomatous polyposis coli), fosforylujú β -katenín. Takto fosforylovaný β -katenín je rozpoznávaný β -Trcp, ubiquitinovaný pomocou E3 (ubiquitin ligáza) a degradovaný v proteazóme. β -katenín neprechádza do jadra a transkripcia cieľových génov je potláčaná väzbou DNA väzobných faktorov TCF (T-bunkový faktor) v komplexe s TLE-HDAC (histondeacetyláza). Väzba Wnt ligandu na Fz (Frizzled) a LRP5/6 (lipoproteínového receptora príbuzný proteín) aktivuje väzbu Dsh (Dishwelled) na cytoplazmatickú časť Fz, fosforyláciu LRP a navedenie Axin komplexu. Axin komplex nezabezpečí fosforyláciu β -katenínu, ktorý nie je ubikvitinovaný a degradovaný. Stabilizuje sa a akumuluje v cytoplazme, prechádza do jadra a v komplexe s TCF aktivuje transkripciu Wnt cieľových génov. (Upravené podľa: MacDonald a kol. 2009).

Signálna dráha Wnt/ β -katenín je extrémne dôležitá pre embryonálny vývoj, osud a proliferáciu bunky, a preto mutácie v nej sú príčinou viacerých vrodených väd (napr. FAP – familiárna adenomatózna polypózia, hereditárna mutácia Axin2 s predispozíciou na kolorektálne nádory), chorôb a vzniku tumorov (Clevers a kol. 2006). So vznikom nádorových ochorení sú spojené inhibičné mutácie predovšetkým tumor-supresorových génov zabezpečujúcich kontrolu nad hladinou

β -katenínu v cytoplazme. Sú to *APC*, *Axin*, *WTX*, ale aj aktivačné mutácie v samotnom onkogénne *β -katenín*.

4.3.1.2. *β -katenín a nádorové ochorenia*

Somatická mutácia v géne *CTNNB1* kódujúci β -katenín je, ako už bolo vyššie uvedené, príčinou viacerých nádorových ochorení, ako kolorektálny karcinóm (až viac ako 50%) (Sparks a kol. 1998), pilomatrixóm, hepatoblastóm, meduloblastóm, rakovina vaječníkov a prostaty (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1499>). Ukazuje sa, že *gain-of-function* mutácia v tyrozín – kinázových doménach tohto génu zabraňuje degradácii β -katenínu v prípade, že už nie je potrebný. Ten sa v bunke začne hromadiť a presúvať do jadra, kde pôsobí ako transkripčný faktor a zabezpečuje nekontrolovaný rast a delenie. Kvôli tejto schopnosti, umožniť normálnej bunke stať sa nádorovou, sa zaraďuje gén *CTNNB1* medzi onkogény (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1>). Nasvedčujú tomu aj jedny z prvých objavených mutácií tohto génu v súvislosti s tumormi, kedy sa zistilo, že mutovaná je len jedna alela génu *CTNNB1* a tá je schopná zabezpečiť odolnosť β -katenínu voči degradácii pôsobením APC. Somatická mutácia má teda dominantný charakter, čo je ďalším znakom onkogénov (Morin a kol. 1997). Výskyt germinálnej mutácie *CTNNB1* bol preukázaný aj u pacientov s ťažkou mentálnou retardáciou, u ktorých de novo mutácia viedla k strate funkcie tohto génu (de Ligt a kol. 2012).

Nádorové ochorenia zapríčinené mutáciou *CTNNB1* génu, a tak zvýšenou expresiou β -katenínu, sú úzko spojené s mutáciami APC génu, ktorý reguluje úroveň β -katenínu (Behrens a kol. 1996). Mutácie APC génu spôsobujú vznik skráteného proteínu, ktorý stratí regulačnú funkciu a dochádza k hromadeniu β -katenínu (Munemitsu a kol. 1995). Súvislosť medzi týmito dvoma génmi a ich mutáciami je najčastejšie spájaná s kolorektálnym karcinómom (Huang a kol. 2000). Ten môže byť dôsledkom mutácií v *β -kateníne*, ktoré postihujú jedno zo 4 fosforylačných miest v blízkosti N –konca β -katenínového proteínu (Koesters a kol. 2001). Taktiež u sporadického hepatoblastómu, najčastejšom malígnom detskom nádore pečene, bola preukázaná vysoká frekvencia mutácií v géne pre β -katenín (Curia a kol. 2007). Obzvlášť dôležité sú mutácie v niektorých kodónoch exónu 3, postihujúce serín/threoninové zvyšky. Tie sú fosforylované komplexom APC, ktorý tým ovplyvňuje degradáciu β -katenínu. Práve v týchto fosforylačných miestach dochádza

k väčšine mutácií zapríčiňujúcich nielen hepatoblastóm, ale aj viacero iných typov nádorov (Morin a kol. 1997). U jednotlivých nádorov sa ale líšia postihnuté kodóny. Konkrétne u hepatoblastómu sú hotspotmi kodóny 32, 34, 37 a 41, v ktorých dochádza k *missense* mutáciám (Udatsu a kol. 2001). U kolorektálneho karcinómu je to substitučná mutácia v kodóne 45, spôsobujúca zmenu serínu za fenylalanín (Koch a kol. 1999).

Spojitosť medzi β -katenínom a ďalším detským nádorom - Wilmsovým nádorom/nefroblastómom, ukázali taktiež viaceré štúdie. Jedná sa o súvislosť aktivačných mutácií v β -kateníne a stratou funkcie WTX proteínu. WTX proteín (kódovaný Wilmsovým tumor génom ležiacim na chromozóme X) je súčasťou komplexu proteínov, podieľajúcich sa na ubiquitinácii a degradácii β -katenínu. V prípade spomínaných mutácií u nefroblastómu dochádza k hromadeniu β -katenínu a tak nekontrolovanej proliferácii buniek (Major a kol. 2007).

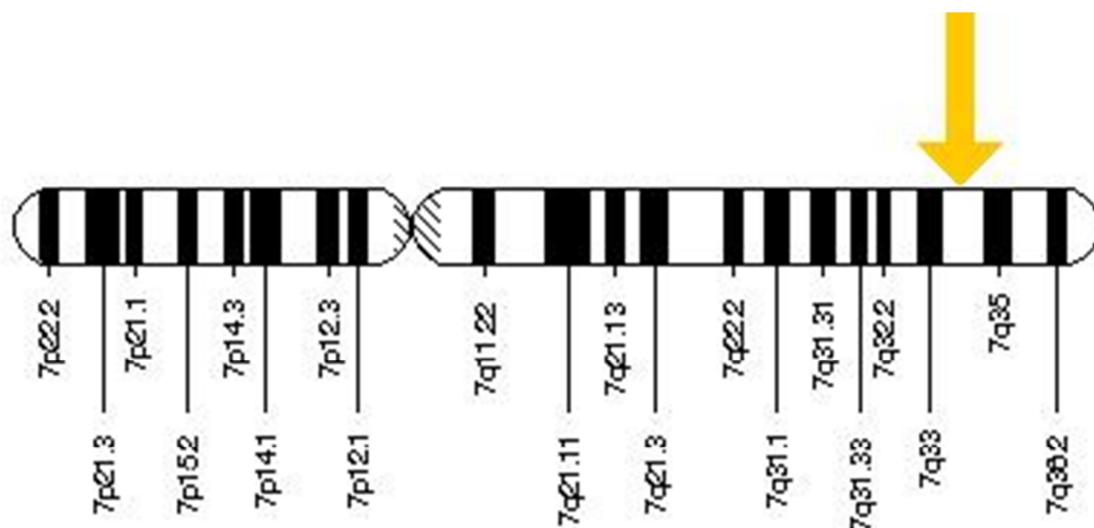
Už dávnejšie štúdie sa zamerali aj na, menej často sa vyskytujúci, sporadický meduloblastóm (Zurawel a kol. 1998, Huang a kol. 2000). Ukázalo sa, že mutácie β -katenínu boli v 8,7 % študovaných sporadických meduloblastómov, pričom sa vyskytovali najmä u detí mladších ako 16 rokov. Väčšina mutácií sa nachádza v kodónoch 33 (substitúcia zo serínu na fenylalanín) a 37 (substitúcia zo serínu na alanín). Kodóny 33 a 37 teda u meduloblastómu predstavujú hotspoty pre mutácie v géne *CTNNB1*. (Huang a kol. 2000). Zaujímavé je, že takmer všetci pacienti s meduloblastómom, u ktorých bola preukázaná mutácia v β -kateníne, mali zároveň deléciu celého chromozómu 6. Zároveň sa potvrdzuje, že asociácia monozómie 6 a mutácie v β -kateníne je prítomná u pacientov I. štádia (Wnt skupina), ktoré je spájané s veľmi dobrou prognózou na prežitie. Naopak u pacientov vyšších gradov nebola mutácia členov Wnt dráhy, teda aj β -katenínu, a strata chromozómu 6 prítomná. Tieto zistenia potvrdzujú, že prítomnosť mutácie génu β -katenín (s monozómiou 6) by mala byť všeobecne prijatá ako determinátor skupiny pacientov štádia I. Taktiež poukazujú na liečbu de-eskaláciou (počiatočná liečba v nižších dávkach), ktorá by mala byť braná do úvahy (Fattet a kol. 2009).

Tým, že je signálna dráha Wnt/ β -katenín relatívne dobre preskúmaná, umožňuje to vyvíjať terapeutickú liečbu zameranú na konkrétne komponenty dráhy. Či už blokovaním väzieb β -katenínu-TCF (Lepourcelet a kol. 2004), alebo stabilizovaním Axin proteínu, ktorý by zabezpečoval degradáciu β -katenínu v nádorových bunkách v prípade, že je potlačená funkcia APC (Chen a kol. 2009).

Ako jednou z možností sa ukazujú tiež látky blokujúce interakciu Fz a Wnt, teda zabráňujúce spustenie samotnej Wnt/ β -katenín signálnej dráhy (Zhang a kol. 2009). Cieľom všetkých týchto terapeutických zameraní je zasiahnutie rakovinových buniek bez poškodenia normálnej bunkovej homeostázy (MacDonald a kol. 2009).

4.3.2 BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)

Génom, súvisiacim so študovanými nádormi, je tiež gén *BRAF*. *BRAF* leží na chromozóme 7q34 a tvorí ho 20 exónov (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>) . Na krátkom ramienku siedmeho chromozómu sa nachádza v rozpätí od bázoého páru 140,719,333 do 140,924,763 (Obrázok č. 6). Zistilo sa, že neaktívny pseudogén *BRAF2* sa nachádza na krátkom ramienku X chromozómu v polohe 13 (Eychene et al. 1992).



Obrázok č. 6: Lokalizácia génu *BRAF* na chromozóme 7 (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRAF>).

Gén *BRAF* kóduje serín/threonínovú proteín kinázu B-raf, ktorá patrí do rodiny RAF proteínov. Proteín B-raf je súčasťou signálnej dráhy RAS/MAPK, v ktorej hrá dôležitú regulačnú úlohu. Ako súčasť tejto signálnej dráhy ovplyvňuje delenie, proliferáciu, diferenciáciu, migráciu a apoptózu buniek (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>, RefSeq, júl 2008). Má úlohu pri prenose vonkajších chemických signálov do vnútra bunky a jeho správna funkcia je nevyhnutná pri prenatálnom vývine (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRAF>).

Reťazec proteínu, kódovaného génom *BRAF*, má dĺžku 766 aminokyselín a začína iniciátorom - Methionínom v pozícii 1. Od pozície 2 po pozíciu 766 pokračuje samotná sekvencia proteínu. Sekundárnu štruktúru B-raf proteínu tvoria alfa helixy,

beta vlákna a otáčky (<http://www.uniprot.org/uniprot/P15056>). Konzervovanou oblasťou je serín/threonínová bohatá oblasť a C-terminálna kinázová doména. V C-terminálnej doméne sa nachádza ATP-väzobné miesto a katalytický lyzín (katalytická funkcia proteínu je závislá od ATP) (Sithanandam a kol. 1990). Typickou štruktúrou sú domény - tzv. „zinc-finger“. Zinc-finger domény sú malé, funkčné, na sebe nezávislé domény, ktoré koordináciou jedného alebo viacerých zinkových iónov stabilizujú svoju štruktúru a líšia sa funkciou, štruktúrou, interakciami a lokalizáciou. V prípade B-raf je aktivita proteínu závislá práve na väzbe Zn^{2+} ako kofaktora v tejto Zinc doméne, ktorá sa konkrétne nachádza v pozícii 234 – 280. Pred Zinc doménou sa ešte v pozícii 155 – 227 nachádza RBD (Ras binding domain), teda Ras väzobná doména a za Zinc doménou, v pozícii 457–717, proteín kinázová doména (<http://www.uniprot.org/uniprot/P15056>).

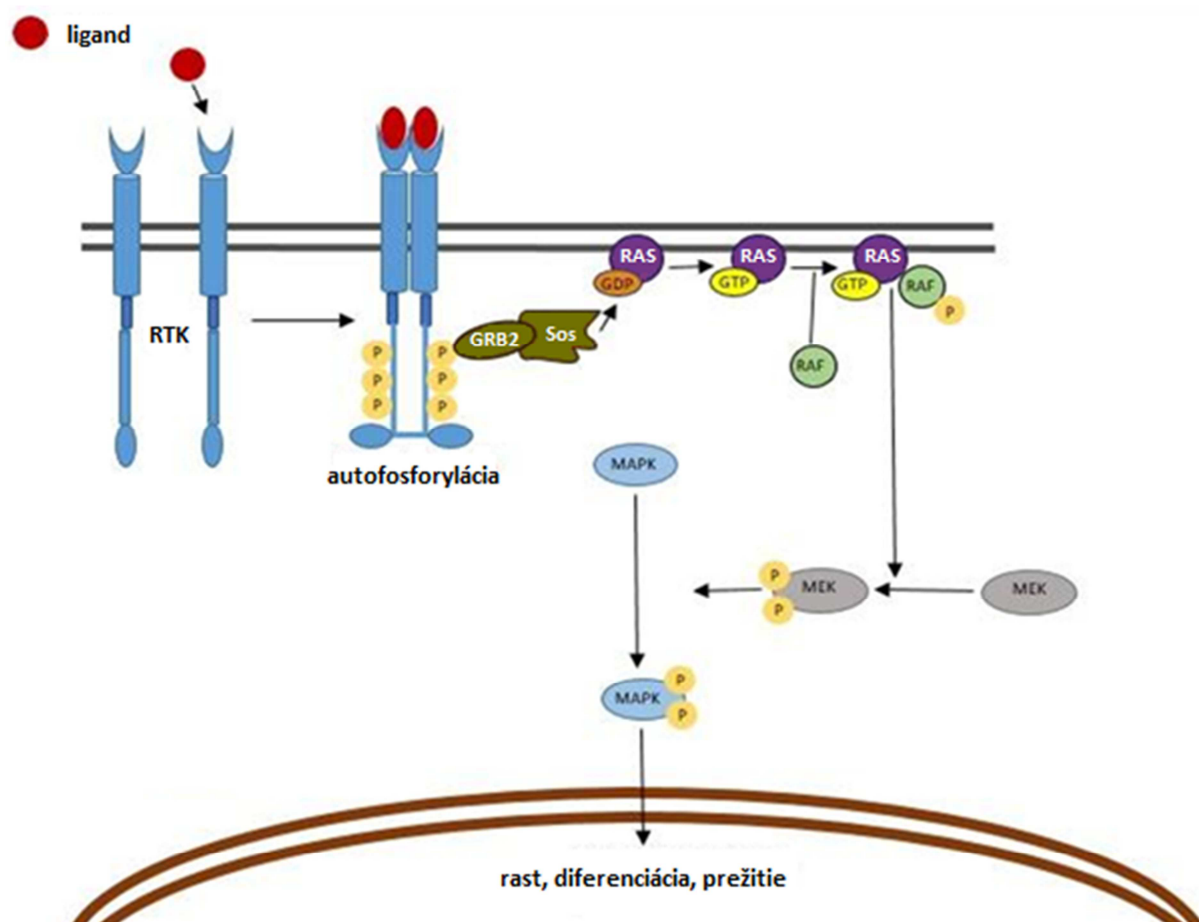
V bunke je B-raf lokalizovaný v cytoplazme aj v bunkovej membráne. Čo sa týka tkanivovej špecificity, je exprimovaný v mozgu a semenníkoch (<http://www.uniprot.org/uniprot/P15056>).

4.3.2.1. MAPK/ERK signálna dráha

B-raf je jedným z funkčných Raf proteín kináz (spolu s A-raf a Raf-1), ktoré sú súčasťou kľúčovej signálnej dráhy, a to MAPK/ERK kaskády (Wan a kol. 2004). MAPKs sú mitogénom aktivujúce proteín kinázy, ktoré stoja za signalizáciou zabezpečujúcou reguláciu expresie génov zodpovedných za proliferáciu, migráciu, diferenciáciu, angiogénu a reguláciu apoptózy buniek (Blumer a Johnson 1994). MAPK/ERK signálna dráha zahŕňa malý G-proteín Ras, ktorý sa viaže na vnútornom povrchu bunkovej membrány (Braun a kol. 2008). Ďalšími proteínmi tejto signálnej dráhy sú spomínané kinázy Raf, ďalej kináza MEK 1/2 a ERK 1/2.

Aktivácia signalizácie je zabezpečovaná ligandom, ktorý sa viaže na RTKs (receptor tyrozín kinázy) na bunkovom povrchu. Naviazanie ligandu zabezpečí autofosforyláciu vlastnej SH2 domény, ktorá priberie rastový faktor Grb2 (adaptorový proteín s SH2 doménou pre aktivovaný receptor) (Knights a kol. 2014). Grb2, prostredníctvom ďalších dvoch domén SH3, lokalizuje GEFs (guanin nukleotid zamieňajúci faktor) na bunkovej membráne a iniciuje zmenu GDP (guanozín difosfát) na GTP (guanozín trifosfát) u Ras proteínu, čím sa Ras stane aktívnym (Vetter a kol. 2001). Aktívny Ras fosforyluje serín/threonínové zvyšky Raf, ktorý

vytvára homo/ heterodíméry a aktivuje sa. Následne Raf fosforyluje serín/threonínové zvyšky MEK 1/2, ktorý je substrátovo špecifický na ERK 1/2 (Obrázok č. 7).



Obrázok č. 7: Po naviazaní ligandu na RTK (receptor tyrozín kináza) dochádza k dimerizácii RTK a autofosforylácii intracelulárných domén diméru. Na fosforylovaný RTK sa viažu adaptorový proteín Grb2 a ten viaže GEF proteín Sos. Sos viaže Ras a vymieňa mu GDP za GTP, čím sa aktivuje Ras kinázová aktivita. Aktivovaný Ras fosforyluje Raf kinázu, ktorá následne fosforyluje a aktivuje MEK kinázu. MEK kináza fosforyluje MAPK kinázu, tá aktivuje expresiu transkripčných faktorov v jadre, ktoré zabezpečujú proliferáciu, diferenciáciu a potláčajú apoptózu (Upravené podľa: Kleinschmidt 2006).

ERK 1/2 vzápätí reguluje cieľové transkripčné faktory zabezpečujúce rast a prežitie. Táto signálna dráha má svoj podiel na regulácii apoptózy tým, že zvyšuje expresiu proteínov „pre prežitie“ (Bcl-2) a antiapoptických proteínov, ktoré sú zodpovedné za degeneráciu proteazómov (Balmanno a kol. 2009).

Mutácie v receptoch a aktivačné mutácie v génoch kódujúcich zúčastnené proteíny (napríklad v géne *BRAF*), spôsobujú konštitutívnu signalizáciu ERK. Dôsledkom je teda nekontrolovaná proliferácia, rezistencia na apoptózu a liečbu (Chappel a kol. 2011). Aktivovaná ERK signálna dráha tiež podporuje expresiu metaloproteinázy, ktorá zabezpečuje degradáciu proteínov extracelulárnej matrix

a teda následnú migráciu nádorových buniek a inváziu tumoru do okolitých tkanív (Chakraborti a kol. 2003). Práve mutácie signálnej dráhy MAPK/ERK sú spájané s viacerými ochoreniami a teda inhibícia jej zložiek sa ukazuje ako sľubný terapeutický cieľ. V súčasnosti je, napríklad u nádorových ochorení, už v predklinických a klinických štádiách viacero inhibítorov proti jednotlivým súčastiam MAPK/ERK signálnej dráhy. Konkrétne inhibítory kinázovej funkcie Raf a MEK predstavujú najviac študovaných a pokročilých prístupov, ktoré majú za cieľ blokovanie jej priebehu. Naopak inhibítory ERK1 a ERK2 doposiaľ neboli popísané (Roberts a Der 2007).

4.3.2.2. BRAF a ochorenia

Gén *BRAF* patrí medzi onkogény, čiže v prípade mutácie je schopný spôsobiť nádorové bujnenie (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>). Mutácie génu *BRAF* boli nájdené v mnohých rozličných typoch nádorových aj nenádorových ochorení, pričom sa jedná prevažne o *missence* mutácie. Najčastejšie sa vyskytujúcou mutáciou, teda hotspotom, je transverzia 1799T>A v kodóne 15. Je to substitučná mutácia, označovaná ako V600E, ktorá zamieňa valín za kyselinu glutámovú. Radí sa medzi aktivačné mutácie, pretože sa ňou zabezpečí permanentne aktívny stav proteínu B-raf a teda zvýšená kinázová aktivita, nezávisle na signalizácii RAS proteínom (Davies a kol. 2002).

Nenádorové ochorenia, ktorých častou príčinou sú práve mutácie génu *BRAF*, sú CFC syndróm (Cardiofaciocutaneous syndrome, obrovský vrodený melanocytárny névus, Leopardí syndróm a Noonan syndróm (Sarkozy a kol. 2009). Navzájom sa líšia svojimi charakteristickými vlastnosťami, ale spoločne sa vyznačujú kožnými poruchami, často spojenými so srdcovo-cievnyimi ochoreniami a odlišnosťami tvárových čŕt. Spoločným molekulárnym základom týchto ochorení sú mutácie v signálnej dráhe RAS/MAPK, ktorej je B-raf súčasťou. V prípade génu *BRAF*, v súvislosti s týmito ochoreniami, boli, okrem hotspotu V600E, objavené viaceré iné typy substitučných heterozygotných mutácií (Rodriguez-Viciano a kol. 2006).

Medzi nádorové ochorenia, ktorých je z veľkej väčšiny príčinou mutácia *BRAF* génu, patrí kožný melanóm. Až u 66 percentách vyšetrovaných prípadov sa vyskytuje mutácia v sekvencii DNA, ktorá kóduje kinázovú doménu B-raf - V600E (Davies a kol. 2002). Menej často sa mutácia *BRAF* génu vyskytuje u kolorektálneho

karcinómu. Ukázalo sa, že táto mutácia je, v prípade kolorektálneho karcinómu, prítomná len za neprítomnosti mutácie *KRAS* génu (Rajagopalan a kol. 2002). Pre pacientov navyše znamená zlý prognostický faktor (Tol a kol. 2009). V menšom percente sa mutácie *BRAF* vyskytujú u pacientov s ľudským karcinómom pľúc. Konkrétne sa jedná o substitučné mutácie v exóne 11 (G465V) a v exóne 15 (L596R) (Naoki a kol. 2002). U nádoroch štítnej žľazy sa mutácia V600E v *BRAF* géne ukazuje ako marker pokročilého štádia ochorenia (Namba a kol. 2003).

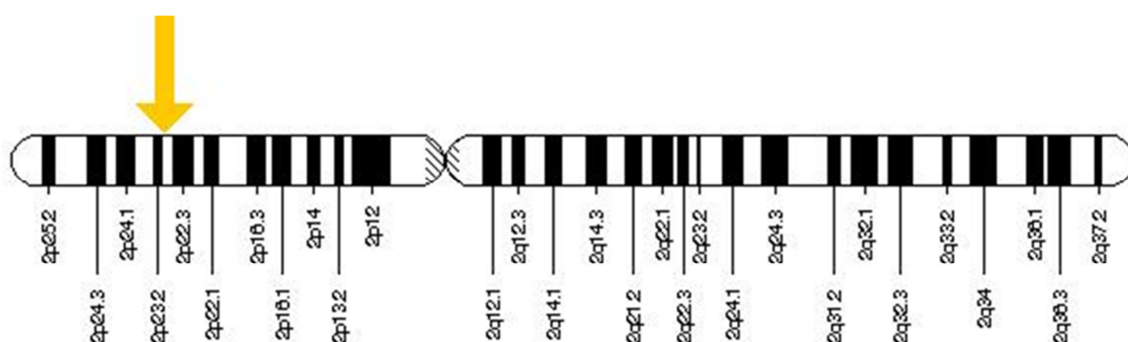
Jedným zo študovaných nádorových ochorení, na ktorý je táto práca zameraná, je astrocytóm. V súvislosti s génom *BRAF* už bolo vykonaných niekoľko štúdií, ktoré potvrdili vplyv jeho mutácií na vývoj sporadického pilocytického astrocytómu (nízke štádium WHO I). Jedná sa o tandemovú duplikáciu v géne 7q34 (Dahiya a kol. 2012). Vedie k vzniku onkogénneho *BRAF*, konkrétne o somatickú 3pb inzerciu v nukleotide 1795/1796 v kodóne 598. Inzercia 3 nukleotidov za 1 nukleotid v pozícii 1795/1796 vedie k zaradeniu threonínu v blízkosti hotspotu V600E, čím sa zabezpečí nepretržite aktívny B-raf (Jones a kol. 2009, Yu a kol. 2009). Konkrétne k tomu dochádza fúziou medzi génmi *KIAA1549* a *BRAF*, kedy *KIAA1549* fúzuje do regiónu *BRAF* génu obsahujúceho kinázovú doménu. Najčastejšie sú to fúzie *KIAA1549* exónu 16 a *BRAF* exónu 9, *KIAA1549* exónu 15 a *BRAF* exónu 9, a *KIAA1549* exónu 16 a *BRAF* exónu 11 (Dahiya a kol. 2012). Prítomnosť fúzneho *KIAA1549/BRAF* sa líši u detí a dospelých. V prípade detského astrocytómu sa vyskytuje v nízkych *gradoch* I a II, u dospelých sa neobjavuje vôbec. Rozdiel vo výskyte je tiež v prípade *BRAF* mutácie V600E. U detí je prítomná vo vyšších *gradoch*, u dospelých naopak u nízkych. Najnovšie štúdiá potvrdili výskyt *BRAF* mutácie V600E aj u 1 % neuroblastómov, ale len v prípade, keď sa nevyskytovala mutácia *ALK* (Shukla a kol. 2011).

Identifikácia hotspotovej mutácie v géne *BRAF* a dôkaz jej výskytu u jednotlivých ochorení, má dôležitý význam pre potenciálne liečebné postupy. Na trhu je už viacero liečiv pôsobiacich ako inhibítory signálnej dráhy MAPK, ktoré sa ukazujú ako veľmi účinné. Jednotlivé inhibítory sa odlišujú svojim cieľom pôsobenia v rámci MAPK/ERK signálnej dráhy, a ich účinnosť sa líši aj od typu ochorenia. Inhibítory *RAF* sú napríklad účinné v tumoroch s *BRAF* mutáciou, ale nie v prípade prítomnosti aj *RAS* aj *BRAF* mutácie (Poulikakos a kol. 2010). Inhibítory *MEK* zabezpečujú v prítomnosti *BRAF* mutácie úplné zastavenie rastu nádoru, ale u *RAS* mutácie len čiastočné (Solit a kol. 2006). Niektoré typy inhibítorov, napríklad *BRAF*

inhibítor Vemurafenib, je síce účinný u melanómu, ale len málo u kolorektálneho karcinómu, u ktorého sa naopak ukazuje účinná kombinácia inhibítora *BRAF* a *EGFR* (Prahallad a kol. 2012).

4.3.3 ALK (Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase)

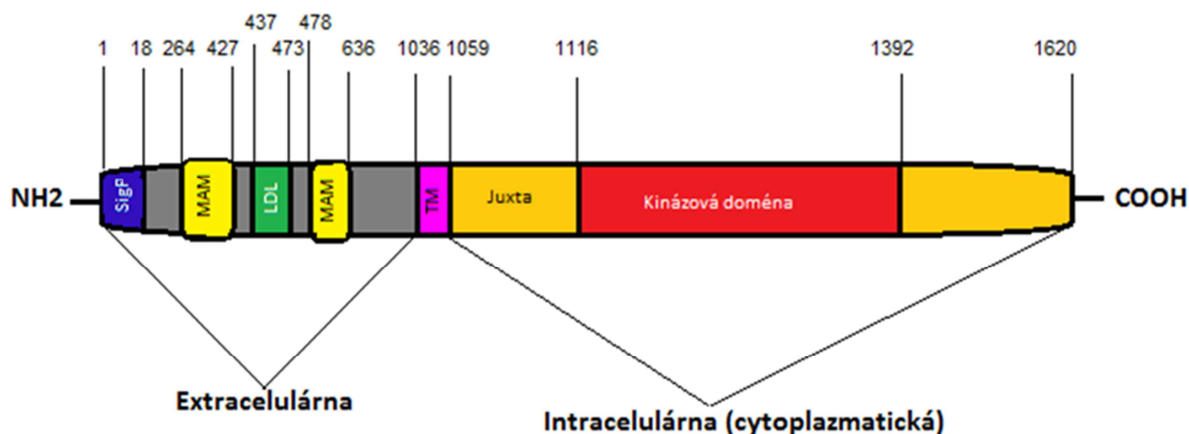
Posledným génom tejto štúdie je gén *ALK*. Leží na krátkom ramienku chromozómu 2, v pozícii 23 (2p23) (Obrázok č. 8), v rozpätí od bázových párov 29,192,773 po bázové páry 29,921,610 (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK>). Má 29 exónov v 728 838 bázach (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ALK>).



Obrázok č. 8: Lokalizácia génu *ALK* na chromozóme 2 (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK>).

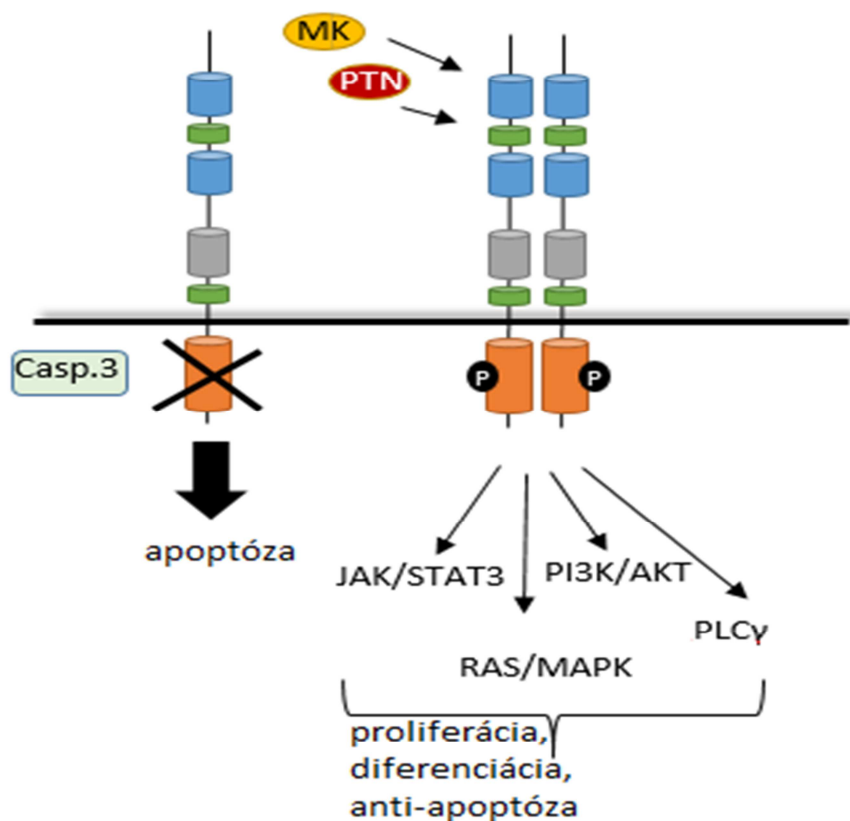
Dĺžka sekvencie je 1620 aminokyselín, pričom samotný reťazec *ALK* receptor tyrozín kinázy začína v 19. aminokyselinovom zvyšku. Sekvencia 1 – 18 patrí signálnemu peptidu. Reťazec tvoria alfa helixy a beta vlákna (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UM73>).

ALK gén kóduje anaplastickú lymfóm tyrozín kinázu, ktorá patrí do rodiny transmembránových receptorových tyrozín kináz (RTKs). Rovnako, ako ostatní členovia tejto rodiny, aj *ALK* sa skladá z extracelulárnej, transmembránovej a intracelulárnej oblasti. Extracelulárnu oblasť tvoria domény MAM1, LDLa a MAM2 a glycín bohatý región. Transmembránovú a intracelulárnu oblasť tvorí Juxta-membránová doména, doména tyrozín kinázy a C-terminálna doména (Obrázok č. 9) (Allouche a kol. 2010).



Obrázok č. 9: Štruktúra ALK tyrozín kinázy. Signálny peptid SigP (aminokyselinový zvyšok 1-18); v extracelulárnej doméne MAM domény (264-427 a 478-636), LDLa doména (437-473); transmembránový segment TM (1036-1059); v intracelulárnej doméne Juxta doména (1059-1116), kinázová doména (1116-1392) a C-terminálna doména (1392-1620) (Upravené podľa: Roskoski 2013).

RTKs, teda tiež ALK, zabezpečuje prenos informácie z povrchu bunky do jej vnútra takzvanou signálnou transdukciou. Tento proces je vyvolaný stimuláciou kinázy, ktorá je väčšinou zabezpečená naviazaním ligandu na extracelulárnu doménu receptora (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK>). Po väzbe ligandu sa kináza dimerizuje a dochádza k autofosforylácii intracelulárnej tyrozín kinázovej domény. Fosforyláciou sa spúšťa aktivita kinázy, ktorá prenáša fosfátovú skupinu na ďalšie proteíny určitých signálnych dráh vnútri bunky a tým zasa spúšťa ich aktivitu. ALK je teda súčasťou signálnych dráh zúčastňujúcich sa proliferácie a diferenciácie buniek (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK>). Jeho pôsobenie na bunku, či už proapopticky alebo antiapopticky, závisí na prítomnosti alebo neprítomnosti ligandu (Mourali a kol. 2006). Takými ligandami pre ALK boli navrhnuté pleiotrophin a midkine (Stoica a kol. 2001, 2002). Sú to rastové faktory, ktoré sú svojou štruktúrou a expresiou počas vývoja podobné ako ALK. Spúšťa dimerizáciu a fosforyláciu ALK a tým aktiváciu signálnej dráhy PI3K/AKT, ktorá stimuluje proliferáciu buniek. Väzba týchto ligandov na ALK aktivuje tiež inhibíciu apoptózy pomocou dráhy RAS-MAPK. Rovnako aktivuje dráhy JAK-STAT a PLCγ (Azarova a kol. 2011). V prípade neprítomnosti ligandu naopak pôsobí ALK pro-apoptoticky, a to prostredníctvom Kaspázy 3, ktorá štiepi a odhaľuje pro-apoptotickú ALK intracelulárnu doménu (Mourali a kol. 2006) (Obrázok č. 10). Priama funkcia ALK je zatiaľ iba predpokladom, a to, že hrá dôležitú úlohu vo vývoji a údržbe nervovej sústavy.



Obrázok č. 10: Kaspáza 3 (Casp.3) štípi intracelulárnu doménu ALK (anaplastic lymphoma receptor tyrozín kináza) a aktivuje pro-apoptotickú dráhu. Vázba ligandu MK/PTN (midkine/pleiotropin) spúšťa dimerizáciu a autofosforyláciu (P) intracelulárnych domén ALK. Aktivovaný fosforylovaný dimér spúšťa kaskádu signálnych dráh pre proliferáciu, diferenciáciu a potlačenie apoptózy (upravené podľa: Grande a kol. 2011).

4.3.3.1. ALK a nádorové ochorenia

Somatické mutácie, zahrňujúce translokáciu za vzniku fúzneho *ALK* génu, sú spojené s viacerými nádorovými ochoreniami (Palmer a kol. 2009). U anaplastického veľko – bunečného lymfómu (vysoké štádium non-Hodgkinovho lymfómu) je charakteristická fúzia génov *ALK* a *NPM1* (translokácia $t(2;5)(p23;q35)$). Ďalším ochorením súvisiacim s fúziou *ALK*u je NCSLC (nemalobunečný karcinóm pľúc). V tomto prípade ide o inverznú fúziu génov *ALK* a *EML4* (Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4) ($inv(2)(p21;p23)$) (Soda a kol. 2007). Iné chromozomálne prestavby, ktorých je *ALK* súčasťou, boli objavené tiež v prípadoch zápalových myofibroblastických nádorov, difúzných veľko B-bunečných lymfómoch a niektorých typov karcinómov pažeráka (Palmer a kol. 2009). Všetky zahŕňajú vznik fúzneho proteínu, ktorý zachováva funkciu oboch fúzovaných proteínov. Partnerský proteín, s ktorým *ALK* fúzuje, umožňuje fosforyláciu *ALK*u bez dimerizácie, čím zabezpečí

nepretržitú aktiváciu katalytickej domény ALKu (Allouche a kol. 2010). Vďaka tomu sú konštitutívne spustené signálne dráhy, ktorých sa ALK zúčastňuje, čo môže to viesť k zvýšeniu proliferácie nedozretých nervových buniek a následne k vzniku nádoru.

4.3.3.2. ALK a neuroblastóm

Dôležitá súvislosť s mutáciami génu *ALK* bola preukázaná aj v prípade neuroblastómu. Neuroblastóm môže vznikať nielen sporadicky, teda získanou mutáciou v *ALK* géne, ale môže mať aj formu zárodočnej mutácie. Zárodočná mutácia *ALK* génu sa dedí autozomálne dominantným spôsobom s neúplnou penetranciou a znamená pre jedinca zvýšené riziko vzniku neuroblastómu. Až u 80 % familiárnych neuroblastómov sa vyskytuje táto heterozygotná mutácia v onkogénne *ALK* (Liu a Thiele 2012). Medzi zistené zárodočné mutácie génu *ALK* patria R1275Q, R1192P a G1128A, pričom najčastejšia je R1275Q (substitúcia guanínu za alanín) (Janoueix-Lerosey a kol. 2008). V prípade sporadických neuroblastómov sa mutácie v *ALK* vyskytujú približne v 6 – 12 % (Greengard a kol. 2010). Bolo zistených 12 konzervatívnych polôh v oblasti tyrozín kinázovej domény, v ktorých sa vyskytujú aktivačné mutácie génu *ALK* (Wood a kol. 2009). Za hlavné hotspoty sú považované 2 mutačné miesta, a to R1275Q (substitúcia guanínu za adenín) a F1174L (substitúcia cytozínu za adenín alebo guanín) (Chen a kol. 2008). Obe tieto mutácie menia konformáciu reťazca, čím narušia stabilitu helixu a umožňujú, rovnako ako u ostatných nádorových ochorení, nepretržitú fosforyláciu ALK bez dimerizácie a následnú aktiváciu cieľových signálnych dráh (Lee a kol. 2010). Okrem bodových mutácií, bola zistená aj amplifikácia *ALK*, a to v približne 2 % prípadov neuroblastómov (De Brouwer a kol. 2011). Jednotlivé mutácie *ALK* génu sú však špecifické iba pre neuroblastómy vysokého rizika, nevyskytujú sa u pacientov stredného a nízkeho rizika. Výnimkou je mutácia F1174L, ktorá v spojení s amplifikáciou *MYCN* vykazuje výrazne zrýchlený nástup ochorenia a zlú prognózu prežitia (Martinsson a kol. 2011). Nedávne štúdie dokonca ukazujú, že v prípade zárodočnej línie je toto spojenie F1174L s *MYCN* letálne (De Brouwer a kol. 2010).

Všetky doterajšie zistenia a štúdie, zaoberajúce sa vzťahom medzi mutáciami *ALK* a spomínanými ochoreniami, dokazujú, že inhibíciou *ALK* expresie dochádza k výraznému poklesu proliferácie nádorových buniek (Janoueix-Lerosey a kol. 2008).

ALK sa preto javí ako dobrý terapeutický cieľ, pričom niekoľko inhibítorov *ALK* génu už prešlo, alebo prechádza predklinickými a klinickými štádiami. Ako prvý bol do klinických štúdií zahrnutý Crizotinib, ktorý vykázal veľmi dobré výsledky u pacientov s NSCLC (Azarova a kol. 2011) a ukazuje sa, že aj u pacientov s neuroblastómom s mutáciou R1275Q alebo amplifikáciou *ALK* (Wood a kol. 2009).

5. Materiál a metódy

5.1. Materiál použitý na analýzu

Materiálom pre analýzu boli vzorky nádorových tkanív, odobraných od pacientov s diagnostikovaným neuroektodermálnym nádorom. Pacienti boli liečení na Klinike detskej hematológie a onkológie UK 2. LF a FN Motol, 3. internej klinike VFN a 1. LF UK. Po diagnostikovaní nádoru boli vzorky odobrané chirurgom v podobe kúskov pevného nádorového tkaniva (resekciou) alebo prostredníctvom biopsie a následne zamrazené. Vzorky potrebné pre štúdium boli v molekulárno – biologickom laboratóriu spracované a bola z nich izolovaná DNA. Po overení kvality vyizolovanej DNA prostredníctvom spektrofotometra bola konkrétna vzorka nádorovej DNA použitá na vlastnú mutačnú analýzu.

K analýze bolo k dispozícii celkom 133 vzoriek rozdelených podľa typu neuroektodermálneho nádoru a študovaného génu. Rozdelenie ukazuje Tabuľka č.1.

Tabuľka č.1: Počet vyšetrených vzoriek na študované gény u jednotlivých nádorov.

typ nádoru	celkový počet vzoriek	vyšetrovaný gén (počet vzoriek)
neuroblastóm	26	<i>BRAF</i> (23), <i>ALK</i> (7)
meduloblastóm	31	<i>BRAF</i> (31), <i>CTNNB1</i> (6)
feochromocytóm	47	<i>BRAF</i>
nádory mozgu	29	<i>BRAF</i>

Primery, použité na analýzu génu *ALK* boli navrhnuté v rámci medzinárodnej štúdie Proposition of SOPs (Adapted from the SOPs of the Neuroblastoma study group of the SFCE Gudrun Schleiermacher, June 2014) a zahŕňajú exóny 23 a 25. *Primery* pre exóny 2 – 4 génu *β-katenín(CTNNB1)* boli navrhnuté podľa štúdie vykonanej Legoix a kol. v roku 1999. Pre exón 15 v géne *BRAF* bol *forward primer* navrhnutý podľa Venesio a kol. z roku 2013 a *reverse primer* Zdenkom Musilom podľa programu Primer 3. Konkrétne sekvencie zobrazuje Tabuľka č.2.

Tabuľka č.2: Sekvencie *primerov* génov *ALK*, *CTNNB1* a *BRAF*.

gén	primer	sekvencia
ALK ex 23	ALK EX23FP	GGAGCCTGCTGTGGTTCTTC
	ALK EX23RP	AGTTGACACCCTGGGTTCC
ALK ex 25	ALK EX25FP	GGAAATATAGGGAAGGGAAGGAACTA
	ALK EX25RP	TGATGTAAGGGACAAGCAGCC
CTNNB1 ex 2-4	CTNNB1 EX2FP	GAAATCCAGCGTGGACAATG
	CTNNB1 EX4RP	TCGAGTCATTGCATACTGTCC
BRAF ex 15	BRAF FP	TTGACTCTAAGAGGAAAGATGAAGT
	BRAF RP	CTGTTCAAACCTGATGGGACCC

5.2. Izolácia DNA z tkanív (Purgene)

Purgene izolácia využíva vysoľovaciu zrážaciu metódu prostredníctvom kitu Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany). Bunky sú lyzované s aniontovým detergentom za prítomnosti stabilizátoru DNA, ktorý zamedzuje činnosť DNáz. RNázy odstránia RNA a proteíny a nečistoty sú odstránené zrazením solí. Genomová DNA je následne izolovaná vyzrážaním s alkoholom a je rozpustená v hydratačnom roztoku. Postup izolácie pozostáva z viacerých krokov a všetky použité chemikálie sú dodané od firmy Qiagen (Düsseldorf, Germany).

Biosan thermo-shaker zahrejeme na 55°C. Z mrazeného alebo čerstvého tkaniva odoberieme 5 – 10 mg, mechanicky dezintergrujeme skalpelom a dáme do skúmavky s objemom 1,5 ml. K vzorke tkaniva pridáme 300 µl Cell Lysis Solution a premiešame pomocou vortexu, čím sa zabezpečí lýza buniek. Do skúmavky pridáme 1,5 µl Puregene Proteinase K (degradácia proteínov) a miešame invertovaním (obracaním) 25-krát. Nasleduje inkubácia na prístroji Biosan zahriatom na 55°C po dobu 3 a viac hodín (lepšie cez noc), kým tkanivo nie je úplne rozpustené. Počas inkubácie je potrebné skúmavku pravidelne invertovať. V prípade použitia Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Germany) nie je nutné vzorku obracať, tento krok nahradíme zapnutím vortexovania na 700 otáčok na 3 a viac hodín.

Centrifúgu Centrifuge 5430R (Eppendorf, Hamburg, Germany) necháme schlaďiť na 4°C. Do vzorky pridáme 1,5 µl RNase A Solution (degradácia RNA) a miešame invertovaním 25-krát. V tomto prípade nie je možné vzorku vortexovať. Vzorku inkubujeme po dobu 30 minút pri 37°C a následne 1 minútu na ľade, čo umožní rýchle schladenie. Pridáme 100 µl Protein Precipitation Solution a miešame

vortexom na najvyššie otáčky 20 sekúnd. Skúmavku premiestnime do centrifúgy schladenej na 4°C a pri tejto teplote centrifugujeme pri 20 817 x g 3 minúty. Dôjde k zrazeniu proteínov, ktoré vytvoria úzku viditeľnú peletu. Do čistej skúmavky odoberieme supernatant zo skúmavky s proteínovou peletou a znova centrifugujeme pri 20 817 x g 3 minúty pri 4°C. Do ďalšej čistej skúmavky si napipetujeme 300 µl izopropanolu a pridáme supernatant, ktorý pipetou odoberieme z predchádzajúcej skúmavky. Skúmavku so supernatantom a izopropanolom invertujeme aspoň 50-krát, kým sa nevyzráža viditeľné biele vlákno. Centrifúgu nastavíme na izbovú teplotu, vložíme skúmavku a centrifugujeme pri 20 817 x g 2 minúty. Supernatant odsajeme a skúmavku opatrne osušíme buničnou vatou. Pridáme 20 až 100 µl DNA Hydravion Solution, pričom množstvo závisí od veľkosti pelety. Zvortexujeme 5 sekúnd a inkubujeme 1 hodinu pri 65°C. Následne necháme vzorku inkubovať cez noc pri miernom trepaní a izbovej teplote, čo zabezpečí že sa DNA rozpustí.

Kvalitu a koncentráciu izolovanej DNA zistíme pomocou spektrofotometra NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware). Koncentrácia, meraná absorbanciou žiarenia pri vlnovej dĺžke 260 nm, musí byť minimálne 30 ng/µl. Čistota DNA, určená pomerom absorbie pri vlnovej dĺžke 260 nm a 280 nm, musí byť v rozsahu 1,7 – 1,95. V prípade, že namerané hodnoty zodpovedajú tejto požiadavke, môžu byť použité k ďalšiemu postupu.

5.3. Sekvenovanie

5.3.1 PCR reakcia

Vzorku DNA, určenú na amplifikáciu, nariedime na koncentráciu 50 ng/µl v TE pufre do celkového objemu 2,5 µl. Potrebné chemikálie dodané výrobcom (Applied Biosystem®; Waltham, Massachusetts, USA) necháme pri izbovej teplote roztopiť a premiešame pomocou vortexu. Na ľade si do čistej skúmavky z príslušných reagentov pripravíme PCR master mix podľa tabuľky č.3.

Tabuľka č.3: Príprava PCR master mixu pre 1 reakciu.

reagenty pre prípravu PCR master mixu	1 reakcia	
H ₂ O	18	μl
PCR pufoer s SO ₄	2,5	μl
MgCl ₂ 25mM	1,5	μl
dNTP mM	0,5	μl
FP (<i>forward primer</i>)10mM	0,5	μl
RP (<i>reverse primer</i>) 10mM	0,5	μl
Polymeráza Fermentaz	0,2	μl

Reakčnú zmes zvortexujeme a pripravíme skúmavky (ependorfky) určené pre PCR, ktoré označíme podľa študovaných vzoriek. Do každej ependorfky pridáme 23,7 μl master mixu a 0,35 μl príslušnej DNA vzorky. Prenesieme do *termocycleru* Labcycler VERITI 96 well thermal cycler (Sensoquest, Gottinger, Germany) na program určený pre PCR reakciu (tabuľka č.4).

Tabuľka č.4: Program pre PCR reakciu.

počet cyklov	čas	teplota
1	3 min	94°C (počiatočná denaturácia dsDNA)
35	30 s	94°C (denaturácia dsDNA)
	30 s	60°C (nasadnutie <i>primerov</i>)
	45 s	72°C (predlžovanie <i>primerov</i>)
1	5 min	72°C (dodyntetizovanie)

V prípade, že vzorka nebude spracovaná hneď, je možné ju týždeň udržiavať pri 4°C, na dlhšie uchovávanie je potrebné vzorku zamraziť na -15 až -25°C.

5.3.2 Elektroforéza

Pripravíme si 1,5% gél na elektroforézu rozmiešaním 0,4 g agarózy v 25 ml 100x zriedeného pufru TBE a zahriatím v mikrovlnke. Teplú zmes nalejeme do dopredu pripravenej a vyváženej doštičky. Podľa počtu vzoriek pridáme hrebeň alebo dva (vytvorenie jamiek) a necháme stuhnúť. Stuhnutý gél vložíme do vaničky, pričom musí byť celý ponorený v TAE. Pripravíme si 2 μl vkladacieho pufru TopBio (koncentrovaný PCR Blue buffer) (Top-Bio, s.r.o., Vestec, Česká republika) pre každú vzorku (napipetovaním na papierik), ktorý zabezpečí vizualizáciu priebehu elektroforézy a klesnutie vzoriek na dno gélu. Po skončení PCR reakcie pridáme k TopBio pufru 8 μl z každého PCR produktu (amplikón) a premiešame pipetou. Veľkostný marker Ready-Load™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies™, Grand

Island, USA) a amplikóny zmiešané s pufrom nanesieme na gél a pustíme elektroforézu na 30 minút na 90 V. Po prebehnutí reakcie gél opatrne vložíme do nádoby s ethidium bromidom (EtBr) na 15 minút, následne opláchneme v nádobe s vodou a pozorujeme pomocou transluminátora UV Transluminator 2000, 240 V a programu Quantity One 4.1.0 (Bio-Rad, Richmond, California) prítomnosť/neprítomnosť DNA (pruhy).

5.3.3 Sekvenačná PCR

V prípade, že elektroforéza potvrdila prítomnosť naamplifikovanej DNA, pokračujeme v sekvenácii so získanými amplikónmi.

Pripravíme si 2 sady ependorfiek, ktoré si odlíšime rozdielnym značením. Jedna sada je určená pre *forward primer*, druhá pre *reverse primer*. Pri izbovej teplote necháme roztopiť chemikálie potrebné pre reakciu (dodané výrobcom Applied Biosystem[®]; Waltham, Massachusetts, USA) a pripravíme z nich 2 master mixy, jeden s použitím *forward primeru* (FP), druhý s *reverse primeru* (RP). Postupujeme podľa tabuľky č.5a a 5b.

Tabuľka č.5a: Príprava master mixu pre *forward primer* (F).

reagenty pre <i>forward primer</i> mix	1 reakcia	
H ₂ O	2,4	μl
Sekvenačná zmes - BigDye Terminátor v 3.1	2,0	μl
FP	0,3	μl

Tabuľka č.5b: Príprava master mixu pre *reverse primer* (R).

reagenty pre <i>reverse primer</i> mix	1 reakcia	
H ₂ O	2,4	μl
Sekvenačná zmes - BigDye Terminátor v 3.1	2,0	μl
RP	0,3	μl

Namiešané master mixy rozdelíme do pripravených a príslušne označených sád ependorfiek po 4,7 μl. K master mixu pridáme 0,35 μl PCR produktu (z kroku 1.), pričom na každý PCR produkt pripadajú 2 ependorfky (jedna zo sady *Forward*, druhá zo sady *Reverse*). Prenesieme do *termocycleru* Labcycler VERITI 96 well thermal cycler (Sensoquest, Gottinger, Germany) na pripravený program pre sekvenačnú PCR (tabuľka č.6).

Tabuľka č.6: Program pre sekvenačnú PCR.

počet cyklov	čas	teplota
1	2 min	96°C (počiatočná denaturácia dsDNA)
25	20 s	96°C (denaturácia dsDNA)
	10 s	50°C (nasadenie <i>primerov</i>)
	4 min	60°C (predĺžovanie <i>primerov</i>)
1	1 min	60°C (dosyntetizovanie)

Po skončení reakcie je potrebné vzorku ihneď, maximálne na druhý deň (skladovanie v chladničke do 4°C), prečistiť.

5.3.4 Čistenie po sekvenačnej PCR

Do čistej skúmavky pripravíme mix z NaOAc (acetát sodný) a EtOH 96% (etanol) podľa tabuľky č.7.

Tabuľka č.7: Príprava mixu na prečistenie.

reagenty pre čistiaci mix	1 reakcia	
NaOAc acetát sodný (3M)	0,5	μl
EtOH 96%	12,5	μl

Do každej skúmavky s PCR produktom z predchádzajúceho kroku pridáme 13 μl namiešaného mixu a necháme 10 - 15 minút pri izbovej teplote. Vzorky centrifugujeme v centrifúge Centrifuge 5430R (Eppendorf, Hamburg, Germany) pri izbovej teplote pri 20 817 x g po dobu 30 minút. Po centrifugácii zo skúmavok odstriekneme tekutinu do buničnej vaty, pričom precipitát je usadený na dne a nie je vidieť. Následne si pripravíme čerstvý 70% EtOH a do každej skúmavky pridáme 60 μl. Znova centrifugujeme pri 20 812 x g po dobu 10 minút pri izbovej teplote. Tekutinu zo skúmaviek odstriekneme do buničnej vaty a opakujeme pridanie 70% EtOH do každej vzorky a následnú centrifugáciu pri 20 817 x g za izbovej teploty po dobu 10 minút. Nasleduje odstrieknutie do buničnej vaty a premiestnenie skúmavok do *termocycleru* Labcycler VERITI 96 well thermal cycler (Sensoquest, Gottinger, Germany) na vysušenie pri teplote 40°C po dobu 10 minút. Počas sušenia nechávame víka eppendorfiiek otvorené. Po vysušení priamo v *termocyclery* pridáme ku každej vzorke 30 μl formamidu Hi-Di^{FM} (Applied Biosystem[®]; Waltham, Massachusetts, USA), víka zavrieme a spustíme program denaturácie pri 95°C po dobu 5 minút. Takto pripravená vzorka sa môže analyzovať v sekvenátore hneď, alebo do 7 dňoch pri skladovaní v chladničke do 4°C. V prípade neskoršej analýzy

ako po 7 dňoch, je potrebné vzorku uložiť do mrazničky na -15 až -25°C obalenú v alobale alebo tmavom boxe.

5.3.5 Príprava vzorky na fragmentačnú analýzu

Do jamiek čistej doštičky The MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystem®; Waltham, Massachusetts, USA), určenej na sekvenáciu, pridáme celý obsah pripravených ependorfiek z predchádzajúceho kroku (do každej jamky jeden prečistený PCR produkt). Doštičku prekryjeme fóliou na PCR. Vzorky sa môžu analyzovať hneď, alebo môžu byť skladované 2 dni v chladničke pri teplote 4°C.

5.3.6 Kapilárna elektroforéza a analýza

Pripravené vzorky v The MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystem®; Waltham, Massachusetts, USA) analyzujeme pomocou automatického sekvenátora ABI 3130/3130xl HITACHI (Applied Biosystem®; Waltham, Massachusetts, USA). Získané dáta sú vyhodnotené pomocou programu Mutation Surveyor® software a porovnané s referenčnými sekvenciami vybranými k príslušným génom (*BRAF* - NC_000007.14; *ALK* - NC_000002.12; *β-katenín (CTNNB1)* - NG_013302.1).

5.4. MLPA

Priebeh vyšetrenia vzoriek prostredníctvom MLPA je zložený z viacerých krokov rozdelených do dvoch dní:

5.4.1 DNA denaturácia a hybridizácia Salsa prób (1. deň)

Reagenty potrebné na prípravu master mixu (dodané výrobcom MRC Holland, Amsterdam, Netherland) necháme roztopiť pri izbovej teplote. Vzorky DNA nariedime na koncentráciu 50 ng/μl. Riedime v TE pufre do celkového objemu 2,5 μl. V rovnakom objeme použijeme pozitívnu kontrolu SD043 Sample DNA. Skúmavky s nariedenými vzorkami DNA a pozitívnou kontrolou prenesieme do *termocycleru* Labcycler VERITI 96 well thermal cycler (Sensoquest, Gottinger, Germany)

a zahrievame, teda denaturujeme, pri 98°C po dobu 5 minút. Dobu zahrievania je možné predĺžiť až na 30 minút. Pred otvorením *termocycleru* znížime teplotu na 25°C a vzorky na túto teplotu schladíme. Po prebehnutí denaturácie si pripravíme hybridizačný master mix podľa tabuľky č.8.

Tabuľka č.8: Príprava hybridizačného master mixu pre 1 reakciu.

reagenty pre hybridizačný master mix	1 reakcia	
SALSA MLPA P370 BRAF-IDH1 IDH2 Probemix (čierne viečko)	0,75	μl
MLPA buffer (žlté viečko)	0,75	μl

MLPA buffer je nutné pred použitím premiešať pomocou vortexu. Po ochladení vzoriek v *termocyclery* na 25°C, ku každej z nich pridáme 1,5 μl hybridizačného master mixu a rozmiešame pipetou. Naleduje rýchle schladenie vzoriek na ľade, aby sa zabránilo renaturácii a inkubácia v *termocyclery* najprv 1 minútu pri teplote 95°C, potom 16 až 20 hodín pri teplote 60°C. Tento krok prebieha cez noc.

5.4.2 Ligačná reakcia (2. deň)

Po inkubácii vzoriek 16 až 20 hodín v *termocyclery* znížime teplotu z 60°C na 54°C, čo zabezpečí prípravu vzoriek na ligáciu, tzv. pre-ligácia. Necháme roztopiť potrebné chemikálie (MRC Holland, Amsterdam, Netherland) pre prípravu ligačného master mixu Ligase-65 a do čistej skúmavky ho namiešame podľa tabuľky č.9.

Tabuľka č.9: Príprava ligačného master mixu pre 1 reakciu.

reagenty pre master mix Ligase-65	1 reakcia	
dH ₂ O	12,5	μl
Ligase buffer A (transparentné viečko)	1,5	μl
Ligase buffer B (biele viečko)	1,5	μl
Ligase enzým-65 (zelené viečko)	0,5	μl

Ligase buffer A a Ligase buffer B je nutné pred použitím zvortexovať. Ku každej vzorke v *termocyclery*, schladeného na teplotu 54°C, pridáme 16 μl Ligase-65 master mixu a pipetou premiešame. Následne necháme 15 minút inkubovať pri teplote 54°C. Počas tejto inkubácie prebieha ligácia. Potom *termocycler* zahrejeme na teplotu 98°C a necháme inkubovať 5 minút. Po skončení inkubácie schladíme vzorky v *termocyclery* na 20°C a vyberieme. Ak nebudeme pracovať so vzorkami hneď ďalej, je možné ich skladovať 7 dní v chladničke pri teplote 4°C.

5.4.3 PCR reakcia (2. deň)

Roztopíme reagenty (dodané výrobcom MRC Holland, Amsterdam, Netherland) potrebné na namiešanie polymeračného master mixu, ktorý pripravujeme na ľade (tabuľka č.10).

Tabuľka č.10: Príprava polymeračného master mixu pre 1 reakciu.

reagenty pre Polymerase master mix	1 reakcia	
dH ₂ O	3,75	μl
SALSA PCR <i>primer</i> mix (hnedé viečko)	1,5	μl
SALSA polymeráza (oranžové viečko)	1,5	μl

SALSA PCR *primer* mix sa musí pred použitím zvortexovať a SALSA polymerase 10 sekúnd zahrievať v ruke. K vzorkám z predchádzajúceho kroku pridáme pri pokojovej teplote 5 μl namiešaného Polymerase master mixu a pipetou rozmiešame. Vzorky preniesieme do *termocycleru* na program pre PCR reakciu (tabuľka č.11).

Tabuľka č.11: Program pre PCR reakciu na MLPA.

počet cyklov	čas	teplota
35	30 s	95°C
35	30 s	60°C
35	1 min	72°C
1	20 min	72°C

Po ukončení PCR reakcie je možné vzorky analyzovať hneď. Pre analýzu do 7 dní je potrebné uskladnenie v chladničke pri 4°C, pre dlhšiu dobu ako týždeň je nutné vzorku zamraziť na -15 až -25°C v alobale alebo v tmavom boxe.

5.4.4 Príprava vzorky na fragmentačnú analýzu (2. deň)

Pri izbovej teplote necháme roztopiť potrebné chemikálie (dodané výrobcom Applied Biosystem[®]; Waltham, Massachusetts, USA) pre prípravu master mixu Formamid HiDi^{FM} podľa tabuľky č.12.

Tabuľka č.12: Príprava Formamid HiDi^{FM} master mixu pre 1 reakciu.

reagenty pre master mix Formamid HiDi ^{FM}	1 reakcia	
Formamid HiDi ^{FM}	12,0	μl
Gene scan ROX 350/LIZ	1,5	μl

Do jamiek čistej doštičky The MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystem[®]; Waltham, Massachusetts, USA) pridáme 12 μl master

mixu Formamid MiDi a 1 µl MLPA produktu. Takto pripravenú doštičku prekryjeme fóliou na PCR. Vzorky sa môžu analyzovať hneď, alebo môžu byť skladované 2 dni v chladničke pri teplote 4°C.

5.4.5 Kapilárna elektroforéza a analýza

Analýza prebieha prostredníctvom automatického sekvenátora ABI 3130/3130xl HITACHI (dodané výrobcom Applied Biosystem[®]; Waltham, Massachusetts, USA). Získané dáta sú následne hodnotené v programe Coffalyser.Net a konečné sekvencie porovnávané s príslušnou referenčnou sekvenciou a pozitívnou kontrolou Binning DNA for P370-B BRAF-IDH1 IDH2.

6. Výsledky

Vzorky, získané biopsicky alebo resekciou od pacientov s diagnostikovaným neuroektodermálnym typom nádoru, boli rozdelené podľa typu nádoru a študovaného génu. Jednotlivé skupiny boli následne analyzované pomocou molekulárne genetických metód, buď priamou sekvenáciou alebo metódou MLPA.

Všetky vyšetrované vzorky boli sekvenované z oboch strán, aby sa zabezpečilo vylúčenie nešpecifícít, pričom za pozitívny výsledok bol považovaný len ten, ktorý vykazoval mutáciu z obidvoch strán. Nepreukázali sme žiadne polymorfizmy mimo sledovaných hotspot mutácií a toto obojstranné sekvenovanie zabezpečilo dostatočne dôveryhodný výsledok, takže nebolo nutné použiť kontroly. Väčšina vzoriek bola osekvenovaná raz, opakované vyšetrenie bolo vykonané len v prípade nekvalitných vzoriek, ktoré po prvotnej sekvenácii vykázali podozrivý výsledok bez jasného nálezu.

6.1. Detekcia mutácie BRAF génu

Pre analýzu vzoriek na dôkaz prítomnosti alebo neprítomnosti mutácie v géne *BRAF* bol k dispozícii najväčší počet vzoriek z viacerých typov neuroektodermálnych nádorov. Konkrétne neuroblastómu, meduloblastómu, feochromocytómu a nádorov mozgu. V prípade prvých troch bola na analýzu použitá metóda klasického Sangerovho sekvenovania, u nádorov mozgu metóda MLPA. Dôvodom výberu metódy MLPA, v prípade nádorov mozgu gliálneho pôvodu, bola možnosť tejto metódy na zachytenie *IDH1*, *IDH2* mutácií a chromozomálnych zmien, typických pre tieto ochorenia. Naopak sekvenácia bola pre vyšetrenie NBL, MBL a FEO použitá kvôli tomu, aby mohla byť preukázaná aj minoritná mutácia génu *BRAF*. Cieľom záujmu diplomovej práce bola konkrétne substitučná mutácia V600E, ktorá je označovaná ako hotspot. Ide o transverziu 1799T>A v kodóne 15, pri ktorej dochádza k zámene valínu za kyselinu glutámovú (bližšie v kapitole 4.3.2). Výsledky boli porovnávané s referenčnou sekvenciou NC_000007.14.

6.1.1 Pacienti s neuroblastómom

Klasifikácia neuroblastómov podľa schémy, vytvorenej Brodeurom v roku 1997, udáva rozdelenie pacientov do 3 skupín. Prognosticky priaznivé sú skupiny I a IIA, skupina IIB sa vyznačuje zlou prognózou. Klasifikácia podľa Brodeura je založená na molekulárno – biologickej podstate (priblížené v kapitole 4.2.3). Systém INSS (The International Neuroblastoma Staging System) z polovice 90-tych rokov udáva rozdelenie neuroblastómu založené na lokalizácii, veľkosti, rozsahu, prítomnosti metastáz a stave lymfatických uzlín. Charakterizuje neuroblastóm do 4 skupín (*staging*), na priaznivé skupiny I, IIA, IIB, IVs a nepriaznivejšie alebo metastatické štádia III a IV. Pri zohľadnení oboch typov klasifikácií, jak molekulárno – biologickú tak histologickú charakteristiku, sa neuroblastómy radia do skupiny LR (nízke riziko), SR (stredné riziko) alebo HR (vysoké riziko).

Vzorky, zahrnuté do tejto štúdie pochádzajú od pacientov zo všetkých klasifikovaných skupín ochorenia. V celkovom počte vzoriek (23), ktoré boli k dispozícii pre detekciu mutácie V600E, nebol preukázaný pozitívny výsledok ani v jednom prípade (Tabuľka č.13).

Tabuľka č.13 : Výsledky sekvenácie mutácie V600E génu *BRAF* u pacientov s neuroblastómom.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	<i>BRAF</i> (V600E)	štádium
č.1	M	0,05	NBL	neg	štádium 1
č.2	M	0,07	NBL	neg	štádium 2
č.3	M	0,12	NBL	neg	štádium 2
č.4	M	0,53	NBL	neg	štádium 1
č.5	F	0,77	ganglio NBL	neg	štádium 1
č.6	M	0,99	NBL	neg	štádium 2
č.7	M	1,03	NBL	neg	štádium 1
č.8	M	1,06	NBL	neg	štádium 2
č.9	F	1,50	NBL	neg	štádium 3
č.10	M	1,74	NBL	neg	štádium 4
č.11	M	1,90	NBL	neg	štádium 3
č.12	M	1,91	NBL	neg	štádium 2
č.13	F	2,06	NBL	neg	štádium 3
č.14	M	2,50	NBL	neg	štádium 3
č.15	F	2,52	ganglio NBL	neg	štádium 3
č.16	M	2,93	NBL	neg	štádium 4
č.17	M	3,22	NBL	neg	štádium 3
č.18	M	3,36	NBL	neg	štádium 2

č.19	F	3,59	NBL	neg	štádium 3
č.20	M	3,79	NBL	neg	štádium 2
č.21	M	3,80	NBL	neg	štádium 4
č.22	M	4,46	NBL	neg	štádium 3
č.23	M	5,63	NBL	neg	štádium 4

Skupinu vzoriek od pacientov s diagnostikovaným neuroblastómom, ktorá bola použitá pre vlastnú analýzu, tvorilo 23 jedincov. Z celkového počtu muži výrazne prevládali nad ženami, konkrétne 18 mužov (M) nad 5 ženami (F). Všetci, okrem 2 pacientov (91,3 %), vykazovali v dobe diagnostiky vek pod 4 roky. Diagnóza bola pacientom stanovená vo veku v priemere 2,15 rokov. Vo štvrtom štádiu ochorenia, podľa klasifikácie systémom INSS, boli 4 pacienti. Do skupiny tretieho štádia patrilo 8 pacientov a do druhého štádia 7 pacientov. Štyria pacienti sa nachádzali v štádiu 1 tohto ochorenia. Dvaja pacienti mali diagnostikovaný ganglioneuroblastóm, ktorý sa vyznačuje vysokým stupňom diferenciácie. Všetci ostatní pacienti mali v rámci diagnózy stanovený neuroblastóm (NBL).

6.1.2 Pacienti s meduloblastómom

Pacienti s diagnostikovaným meduloblastómom, ktorý patrí medzi embryonálne neuroektodermálne nádory, sú, podľa WHO klasifikácie z roku 2007, rozdelení do 4 skupín na základe typu nádoru. Do 1. skupiny patrí klasický meduloblastóm, do 2. desmoplastický, do 3. meduloblastóm s extenznou nodularitou a do 4. skupiny patrí anaplastický meduloblastóm. Všetky meduloblastómy zároveň vykazujú stupeň malignity (*grade*) 4, ktorý sa vyznačuje agresívnym rastom, výrazne abnormálnymi bunkami a nízkou úspešnosťou liečby (Louis a kol. 2007).

Pre sekvenovanie, s cieľom určiť prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF*, bolo k dispozícii 31 vzoriek od pacientov s diagnostikovaným meduloblastómom. Rovnako, ako pri neuroblastóme, boli všetky vzorky negatívne na prítomnosť študovanej mutácie (Tabuľka č.14).

Tabuľka č.14: Výsledky sekvenácie mutácie V600E génu *BRAF* u pacientov s meduloblastómom.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	<i>BRAF</i> (V600E)	typ nádoru a <i>grade</i>
č.1	M	13,20	MBL	neg	<i>grade</i> 4
č.2	F	5,22	MBL	neg	<i>grade</i> 4
č.3	M	1,59	MBL	neg	<i>grade</i> 4

č.4	F	3,22	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.5	M	6,85	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.6	F	2,48	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.7	F	0,29	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.8	F	9,12	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.9	M	1,09	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.10	F	16,91	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.11	M	10,63	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.12	M	4,33	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.13	M	14,81	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.14	F	9,52	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.15	F	7,10	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.16	M	8,66	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.17	F	9,96	MBL	neg	anaplastický, <i>grade 4</i>
č.18	M	9,22	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.19	F	12,46	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.20	F	11,67	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.21	M	4,19	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>
č.22	M	18,06	MBL	neg	desmoplastický, <i>grade 4</i>
č.23	M	17,21	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.24	F	1,76	MBL	neg	s extenzívnou nodularitou, <i>grade 4</i>
č.25	M	2,06	MBL	neg	desmoplastický, <i>grade 4</i>
č.26	M	9,96	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>
č.27	M	6,14	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>
č.28	M	13,26	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.29	M	10,29	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>
č.30	M	3,98	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>
č.31	M	8,63	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>

Celkový počet vzoriek od pacientov s meduloblastómom (31) tvorilo 19 mužov (61,3%) a 12 žien (38,7%), teda muži prevládali, čo potvrdzuje údaje v literatúre o všeobecnej charakteristike meduloblastómu. Priemerný vek v dobe diagnostikovania ochorenia bol 8,19 rokov. Najmladší pacient bol vo veku 0,29 a najstarší vo veku 18,06 rokov. U všetkých pacientov bol stanovený stupeň malignity (*grade*) číslo 4, u 10 pacientov bol podľa WHO klasifikácie stanovený aj typ nádoru, u zvyšných 21 nebol typ bližšie definovaný. Ani v jednom prípade neboli prítomné metastázy, čo je v prípade meduloblastómu typické.

6.1.3 Pacienti s feochromocytómom

V prípade diagnostikovania feochromocytómu sú pacienti rozdeľovaní do dvoch skupín podľa miesta vzniku a iných identifikačných parametrov, konkrétne do skupiny klasického feochromocytómu a skupiny paragangliomu (kapitola 4.2.4). Po osekvenovaní všetkých dostupných vzoriek od pacientov, nebola nepotvrdená prítomnosť mutácie V600E v *BRAF* géne ani v jednom prípade, teda výsledok sekvenácie pre túto mutáciu bol u všetkých pacientov negatívny (Tabuľka č.15).

Tabuľka č.15: Výsledky sekvenácie mutácie V600E génu *BRAF* u pacientov s feochromocytómom.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	<i>BRAF</i> (V600E)
č.1	F	36,98	FEO	neg
č.2	M	17,59	FEO	neg
č.3	F	13,03	FEO	neg
č.4	F	33,75	PARA	neg
č.5	M	50,33	FEO	neg
č.6	F	12,68	FEO	neg
č.7	F	35,30	FEO	neg
č.8	F	77,24	FEO	neg
č.9	M	6,73	FEO	neg
č.10	F	63,49	FEO	neg
č.11	M	14,54	FEO	neg
č.12	M	34,84	FEO	neg
č.13	F	31,13	FEO	neg
č.14	M	52,54	bilaterálny FEO	neg
č.15	F	59,61	FEO	neg
č.16	M	23,41	FEO	neg
č.17	M	59,39	FEO	neg
č.18	F	26,99	FEO	neg
č.19	M	61,68	FEO	neg
č.20	M	76,61	FEO	neg
č.21	M	53,61	FEO	neg
č.22	M	13,05	FEO	neg
č.23	M	26,21	FEO	neg
č.24	F	65,77	FEO	neg
č.25	M	40,11	bilaterálny FEO	neg
č.26	M	40,01	FEO	neg
č.27	F	67,83	FEO	neg
č.28	F	67,32	FEO	neg
č.29	F	76,97	FEO	neg
č.30	F	25,30	FEO	neg

č.31	M	19,90	FEO	neg
č.32	M	26,46	PARA	neg
č.33	F	65,54	FEO	neg
č.34	F	15,04	FEO	neg
č.35	M	46,76	FEO	neg
č.36	M	42,96	FEO	neg
č.37	F	75,91	PARA	neg
č.38	F	32,89	FEO	neg
č.39	F	57,64	FEO	neg
č.40	M	50,21	FEO	neg
č.41	F	61,53	FEO	neg
č.42	M	51,00	FEO	neg
č.43	F	9,66	FEO	neg
č.44	F	14,26	FEO	neg
č.45	M	74,78	FEO	neg
č.46	F	73,47	PARA	neg
č.47	M	59,43	FEO	neg

Celkový počet vzoriek bol 47. Z tohto súboru pacientov mali 4 z nich diagnostikovaný paragangliom (PARA) a zvyšných 43 feochromocytóm (FEO). Dvaja zo skupiny FEO sa vyznačovali prítomnosťou bilaterálneho FEO. Percentuálne vyjadrenie výskytu v našej skupine je 8,51 % PARA a 91,49 % FEO (pomer 1:10,75), pričom všeobecne udávaný výskyt PARA a FEO je v pomere približne 15 % : 85 % prípadov (pomer 1:5,67). Počet mužov bol 23 a žien 24, čo je približne 50 : 50. Táto skutočnosť potvrdzuje fakt, že výskyt feochromocytómu sa medzi pohlaviami nerozlišuje. Postihnutí sú väčšinou jedinci vo veku od 30 do 50 rokov. Priemerný vek v tejto skupine pacientov je 43,44 rokov, čo spadá do tohto rozmedzia.

6.1.4 Pacienti s nádorom mozgu

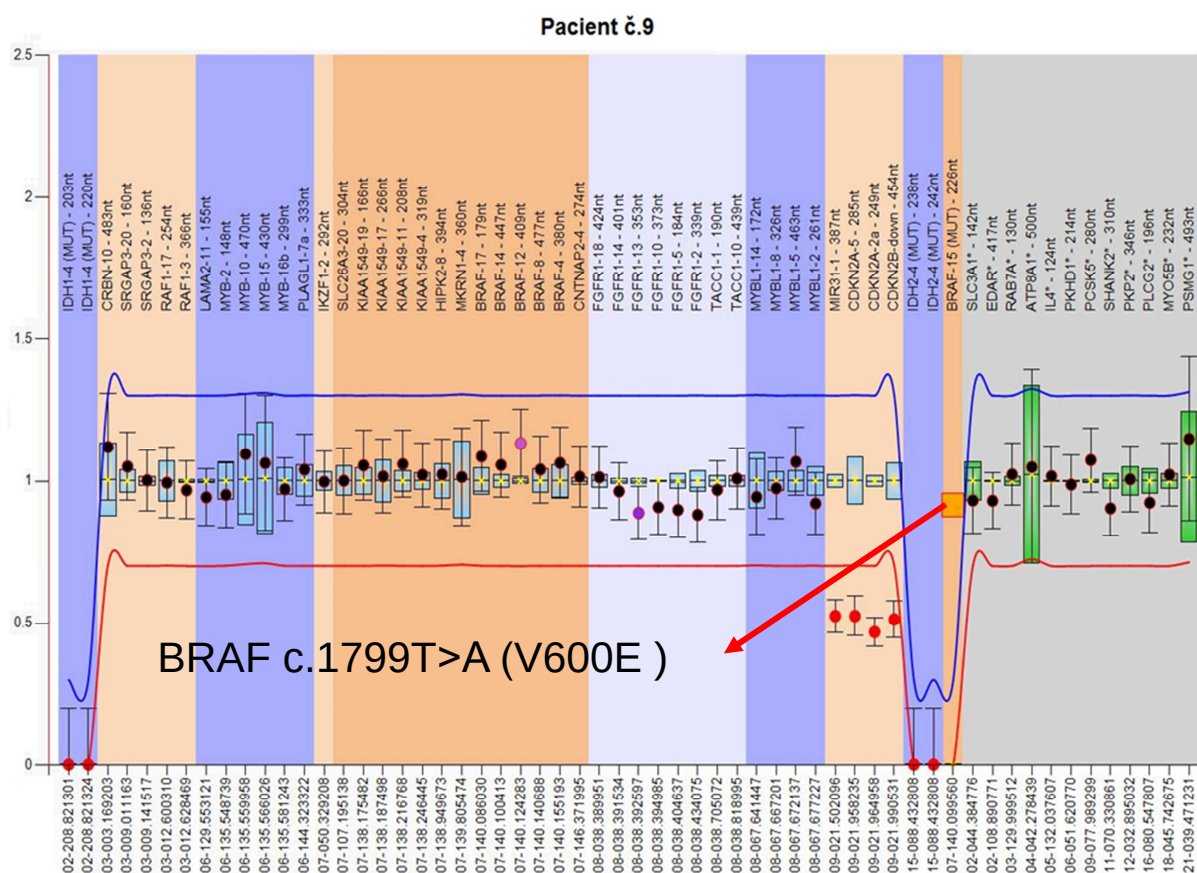
Zo skupiny nádorov mozgu boli dostupné 4 glioblastómy, 4 gangliogliomy a v najväčšom počte astrocytomy, ktorých bolo 21. Vzorky boli vyšetrované metódou MLPA s použitím kitu P370, pomocou ktorého bola, okrem iného detegovaná, mutácia V600E v géne *BRAF*, na ktorú je táto práca zameraná. Výsledky ukazuje Tabuľka č.16.

Tabuľka č.16: Výsledky mutácie V600E génu *BRAF* pomocou MLPA u pacientov s nádormi mozgu.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	grade	<i>BRAF</i> V600E (kit P370)
č. 1	F	0,13	astrocytóm	grade 2	neg
č. 2	F	1,28	astrocytóm	grade 1	neg
č. 3	M	2,01	astrocytóm	grade 1	neg
č. 4	F	2,60	astrocytóm	grade 1	neg (gain 7q34)
č. 5	M	3,13	astrocytóm	grade 1	neg (gain 7q34)
č. 6	M	3,48	astrocytóm	grade 2	neg (gain 7q34)
č. 7	M	6,01	astrocytóm	grade 1	neg
č. 8	M	6,07	astrocytóm	grade 1	neg (gain 7q34)
č. 9	F	7,66	astrocytóm	grade 2	poz (V600E)
č. 10	M	9,12	astrocytóm	grade 1	neg
č. 11	M	9,29	astrocytóm	grade 1	neg (gain 7q34)
č. 12	F	9,98	astrocytóm	grade 1	neg
č. 13	F	10,29	astrocytóm	grade 1	neg (gain 7q34)
č. 14	F	11,28	astrocytóm	grade 3	neg
č. 15	F	11,29	astrocytóm	grade 1	neg
č. 16	M	11,93	astrocytóm	grade 3	neg
č. 17	F	15,91	astrocytóm	grade 1	neg
č. 18	M	17,14	astrocytóm	grade 3	poz (V600E)
č. 19	M	17,79	astrocytóm	grade 2	neg
č. 20	F	18,41	astrocytóm	grade 3	neg
č. 21	M	21,16	astrocytóm	grade 2	neg
č. 22	F	3,37	glioblastóm	grade 4	neg
č. 23	M	4,88	glioblastóm	grade 4	neg
č. 24	M	33,39	glioblastóm	grade 4	neg (gain 7q34)
č. 25	F	33,73	glioblastóm	grade 4	neg (gain 7q34)
č. 26	M	9,95	gangliogliom	grade 1	neg (gain 7q34)
č. 27	M	11,61	gangliogliom	grade 1	neg
č. 28	F	11,81	gangliogliom	grade 1	neg
č. 29	F	18,88	gangliogliom	grade 2	neg

Celkový počet vzoriek bol 29, pričom pomer mužov a žien bol 15 : 14 a priemerný vek 11,16 rokov. Pacienti s glioblastómom mali všetci klasifikovaný stupeň malignity 4, traja pacienti s gangliogliomom vykazovali *grade* 1 a jeden *grade* 2. V prípade astrocytómu bol stanovený *grade* 1 (12 pacientov), *grade* 2 (5 pacientov) a *grade* 3 (4 pacienti). Pomocou kitu P370 bola potvrdená prítomnosť mutácie V600E u dvoch pacientov s astrocytómom (č.9 a č.18) (Obrázok č.11), z ktorých jeden mal stupeň malignity 2 a druhý 3. U zvyšných 27 pacientov bol výsledok na detekciu mutácie V600E negatívny. 9 pacientov ale vykázalo *gain* 7q34,

konkrétne v exónoch 19, 17, 11, 4 génu *KIAA1549* a exónoch 17, 14, 12, 8, 4 génu *BRAF* a predpokladom je, že to viedlo k vzniku fúzneho génu *KIAA1549/BRAF* a tým aktivácii onkogénneho *BRAF*.



Obrázok č.11: Výsledok MLPA potvrdzujúci prítomnosť mutácie V600E v exóne 15 génu *BRAF* u pacienta č.9.

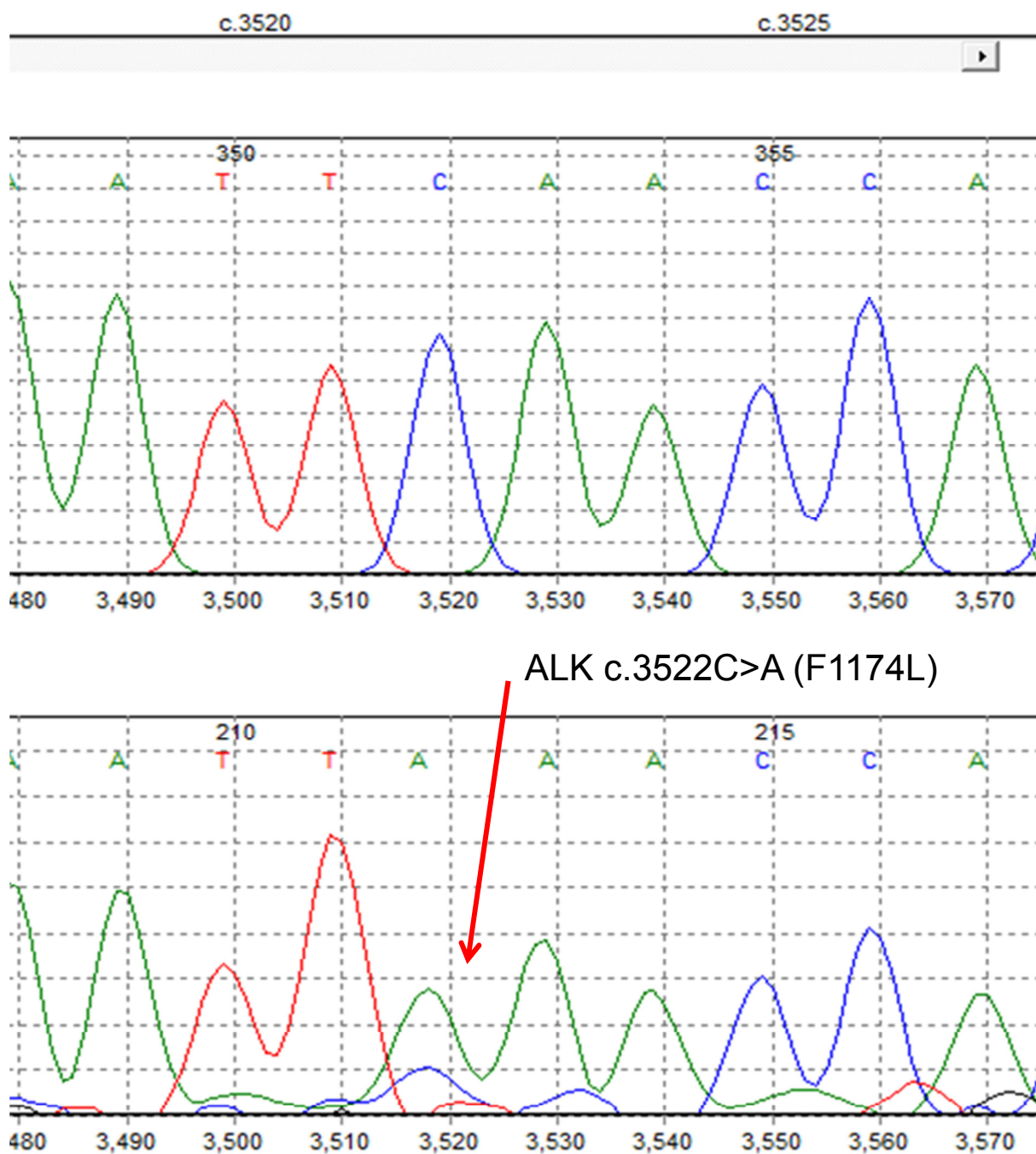
6.2. Detekcia mutácie *ALK* génu sekvenovaním

Pri detekcii mutácie génu *ALK* bola cieľom skupina vybraných pacientov s diagnostikovaným neuroblastómom. Konkrétnym predmetom záujmu v rámci *ALK* génu boli exóny 23 a 25, v ktorých sú mutačné miesta považované za hotspots (kapitola 4.3.3). Doposiaľ získané výsledky, ktoré boli vyhodnotené porovnaním s referenčnou sekvenciou NC_000002.12, ukazuje Tabuľka č.17. Ďalšie vzorky sú stále v procese vyšetrovania.

Tabuľka č.17: Výsledky sekvenácie mutácií v exóne 23 a 25 génu *ALK* u pacientov s neuroblastómom.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	klinické štádium	<i>ALK</i> 23 exón	<i>ALK</i> 25 exón
č.1 (17)	M	3,22	NBL	štádium 3	neg	neg
č.2 (19)	F	3,59	NBL	štádium 4	neg	neg
č.3	M	0,69	NBL	štádium 4	neg	neg
č.4	F	1,93	NBL	štádium 4	neg	neg
č.5	F	3,27	NBL	štádium 4	neg	neg
č.6 (5)	M	0,77	ganglio NBL	štádium 1	neg	neg
č.7 (18)	M	3,36	NBL	štádium 3-4	neg	poz (c.3522C>A p. F1174L)

Vyšetrených pacientov bolo celkové množstvo 7, pričom 4 z nich boli súčasťou skupiny pre detekciu mutácie *BRAF* génu (číslo pacienta v zátvorke zodpovedá číslu pacienta v Tabuľke č.13). Muži v tejto vybranej skupine prevládali s počtom 5 nad ženami v počte 2. Pacienti sa nachádzali v rôznych štádiách ochorenia, jeden v treťom štádiu, 1 vo štvrtom štádiu a 1 medzi 3. a 4. štádiom ochorenia. Jednému pacientovi bol diagnostikovaný ganglioneuroblastóm a nachádzal sa v prvom štádiu ochorenia. Sekvenácia bola vykonaná na dvoch exónoch (23 a 25) v géne *ALK* so zameraním na 2 substitučné mutačné miesta. V exóne 23 to bolo miesto R1275Q, ktorého sekvenácia v prípade všetkých vzoriek vykázala negatívny výsledok. Naopak, pozitívny výsledok v mutačnom mieste F1174L exónu 25 bol potvrdený u pacienta č.7 (Obrázok č.11). U ostatných, doposiaľ vyšetrených pacientov, bol výsledok negatívny.



Obrázok č.11: Výsledok sekvenácie potvrdzujúci prítomnosť substitučnej mutácie ALK F1174L u pacienta č.7, porovnaním s referenčnou sekvenciou NC_000002.12.

6.3. Detekcia mutácie génu β -katenín sekvenovaním

Výber vzoriek pre sekvenovanie génu β -katenín (*CTNNB1*) bol cielene zameraný na pacientov s diagnózou meduloblastómu. V tomto prípade je dôležité zohľadnenie rozdelenia pacientov podľa klasifikácie, ktorú publikoval Taylor a kol. v roku 2011 a je založená na molekulárno – genetickom základe, konkrétne na chromozómových aberáciách typických pre jednotlivé skupiny. Tá rozdeľuje

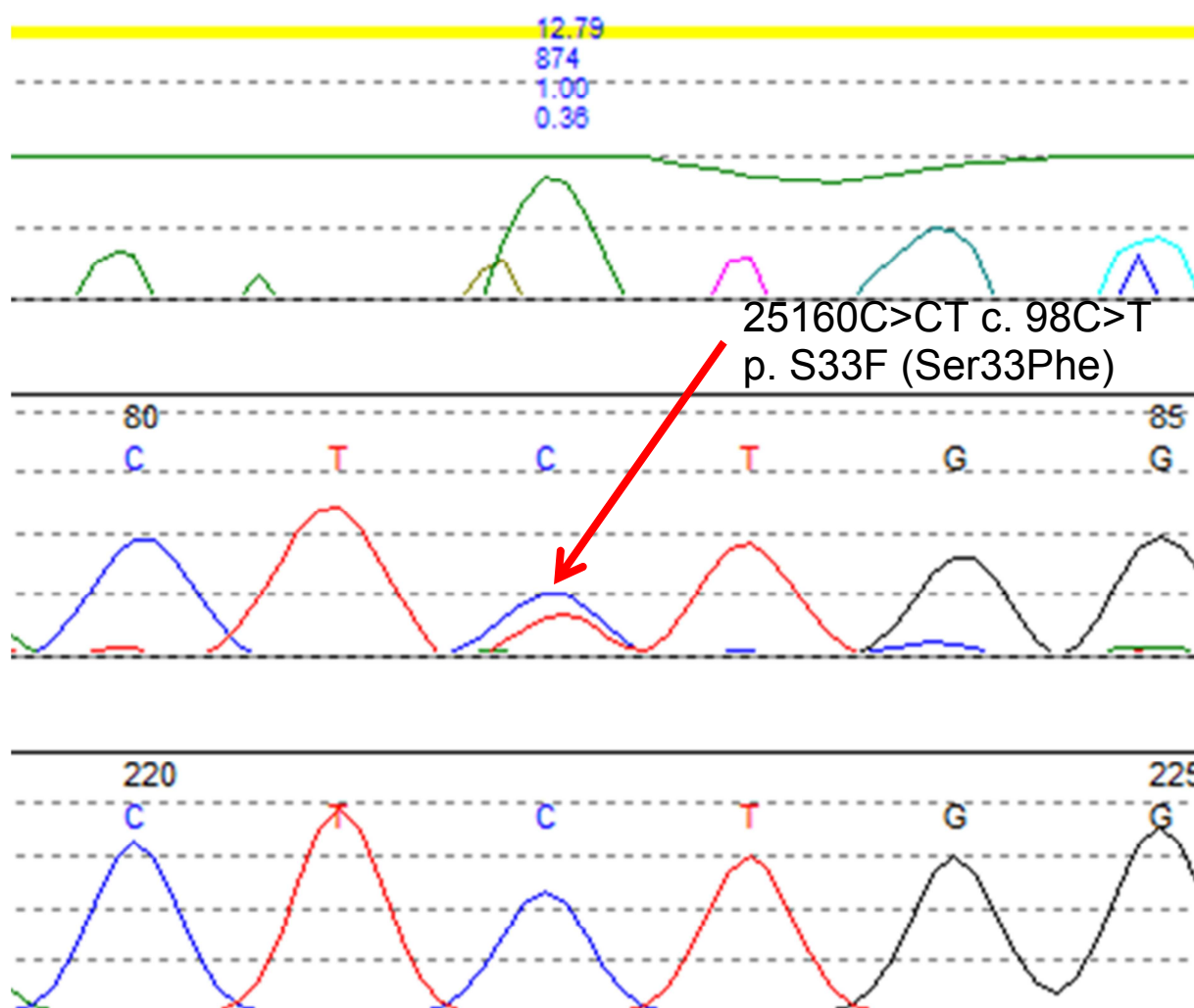
pacientov do štyroch skupín I - IV, pričom I. skupina je charakteristická práve mutáciou v β -*katenín* (bližšie popísané v kapitole 4.2.2.1).

Pacienti boli vybraní po predchádzajúcom vyšetrení pomocou metódy FISH (Fluorescence in situ hybridization) a MLPA, pričom hlavným kritériom bolo potvrdenie delécie celého chromozómu 6. Práve monozómia 6 je predpokladom prítomnosti mutácie v géne β -*katenín*. Výsledky boli porovnávané s referenčnou sekvenciou NG_013302.1. Vybraní pacienti boli testovaní aj na prítomnosť mutácie V600E génu *BRAF* (číslo pacienta zodpovedá číslu pacienta v Tabuľke č.14). Výsledky zobrazuje Tabuľka č.18.

Tabuľka č.18: Výsledky sekvenácie mutácií génu β -*katenín* u pacientov s meduloblastómom s potvrdenou monozómiou chromozómu 6.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	typ nádoru a grade	β - <i>katenín</i>
č.8	F	9,12	MBL	grade 4	neg
č.13	M	14,81	MBL	grade 4	neg
č.14	F	9,52	MBL	klasický, grade 4	poz (c.101G>T p.G34V)
č.15	F	7,1	MBL	grade 4	poz (c.98 C>T p.S33F)
č.19	F	12,46	MBL	grade 4	poz (c.97C>T p. S33P; c.111T>C p. S37S)
č.31	M	8,63	MBL	klasický, grade 4	poz (c.98 C>T p.S33F)

Počet vzoriek bol 6, z čoho muži boli dvaja a ženy štyri. Priemerný vek diagnostikovania ochorenia bol 10,27 rokov. Potvrďuje to klinické údaje o výskyte mutácie β -*katenínu* vo Wnt skupine meduloblastómov, ktoré uvádzajú vyšší vek pacientov, no nie vek nad 16 rokov. U pacientov č.8 a č.13 nebola potvrdená prítomnosť mutácie génu β -*katenín*, aj napriek prítomnej delécie chromozómu 6. Ostatní pacienti zo študovanej skupiny vykázali pozitívny výsledok, čím sa potvrdila prítomnosť mutácie v β -*kateníne* (c.98 C>T p.S33F). Obrázok č.12 zobrazuje pozitívny výsledok u pacienta č.31.



Obrázok č.12: Výsledok priamej sekvenácie u pacienta č.31 porovnávaný s referenčnou sekvenciou NG_013302.1 (dole).

7. Diskusia

Neuroektodermálne nádory, konkrétne nádory CNS, patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce nádory u detí, no sú prítomné aj u dospievajúcich a dospelých jedincov. Práca sa zamerala na najpočetnejšie nádory z tejto skupiny, a to meduloblastóm, neuroblastóm a vybrané nádory mozgu. Do štúdie bol zaradený aj feochromocytóm, ktorý nepatrí do skupiny nádorov CNS, ale rovnako vzniká z neuroektodermu. Na základe rovnakého pôvodu bola predpokladaná možnosť spoločných príčin vzniku nádoru, ako u ostatných študovaných tumorov. U neuroblastómu a meduloblastómu sú známe prognostické ukazovatele v podobe mutácií konkrétnych génov, na základe ktorých sa určuje ich molekulárne - biologická klasifikácia. Práve na detekciu týchto mutácií sa v súčasnosti sústreďujú štúdie, a to s cieľom zavedenia inhibítorov mutovaných génov ako vhodnejšej liečby. Rovnako cieľom práce bolo preukázanie mutácií u 3 génov (*BRAF*, *ALK* a *β-katenín*), ktoré sú spájané s príčinami vzniku vybraných nádorových ochorení. Jedná sa o somatické mutácie, germinálne mutácie študované neboli. U *ALK* génu to bolo kvôli tomu, že nebola k dispozícii germinálna DNA a súhlas pacientov s jej vyšetrením do tejto štúdie, ani súhlas etickej komisie a nebolo to cieľom tejto práce. V prípade génu *BRAF* a *β-katenín* bolo dôvodom to, že sa v týchto génoch germinálne mutácie nevyskytujú. S tým súvisí aj to, že nenádorové bunky pacientov sú negatívne, pričom ani všetky nádorové bunky nemusia mať prítomnú preukázanú mutáciu. Táto heterogénna populácia komplikuje jednoznačný dôkaz mutácie a závisí na pomere mutovanej a nemutovanej alely v celkovom obsahu vyizolovanej DNA. Upresnenie by mohlo priniesť využitie „deep NGS“ (Next Generation Sequencing) sekvenácie, kde je možné spoľahlivejšie preukázať aj prítomnosť malého klonu nádorových buniek s mutáciou.

Vyšetrených bolo celkom 133 vzoriek z vyššie uvedených nádorov, pričom najväčší počet bol použitý na detekciu mutácie v géne *BRAF*. Jedná sa o mutáciu V600E, ktorá je považovaná za hotspot, zabezpečuje zvýšenú kinázovú aktivitu proteínu B-raf a tým transformačnú aktivitu buniek. Podstatou je aminokyselinová substitúcia valínu za kyselinu glutámovú, ktorú zapríčiňuje transverzia v kodóne 600, konkrétne v exóne 15 (1799T>A) (Davies a kol. 2002).

Fakt, že mutácia V600E pokrýva približne 80 až 90 % vyskytujúcich sa *BRAF* mutácií (Rubinstein a kol. 2010), bol jedným z dôvodov, prečo bola diplomová práca na tento hotspot zameraná. Davies a kol. v roku 2002 potvrdili prítomnosť *missence* mutácie V600E u 66 % zo skupiny vyšetovaných pacientov s malígnym melanómom, ktorý takisto patrí medzi neuroektodermálne nádory. Následné štúdie vykázali o niečo menší výskyt (37 až 50 %) tejto mutácie u melanómu (Hodis a kol. 2012, Maldonado a kol. 2009). Prítomnosť mutácie V600E zvyšuje účinnosť *BRAF* inhibítorov, ktorých je v súčasnosti na trhu viacero a v prípade melanómu sa ukazujú ako veľmi účinné. Prvým personalizovaným inhibítorom bol Vemurafenib od firmy Roche (Basel, Switzerland), ktorého účinnosť u 48 % liečených pacientov s melanómom preukázal v štúdií Chapman a kol. (2011). U nádorov s preukázanou mutáciou *BRAF* V600E prebieha niekoľko klinických štúdií na overenie citlivosti týchto inhibítorov, vrátane terapie mozgových nádorov. Výsledky týchto štúdií však nie sú v súčasnosti dostupné.

Tieto pozitívne výsledky viedli k rozšíreniu štúdií na iné nádory vznikajúce z neuroektodermy, vychádzajúce z podobnosti pôvodu s melanómom. Shukla a kol. v roku 2011 publikoval štúdiu, ktorá zahŕňala identifikáciu mutácií onkogénov u neuroblastómu pomocou Sangerovho sekvenovania. Okrem iných, bol súčasťou štúdie aj gén *BRAF*, ktorého mutáciu V600E bola potvrdená v 1 % zo 192 vyšetrených vzoriek neuroblastómu. Táto štúdia prvýkrát načrtla možnosť, že by mutácia V600E mohla zohrávať úlohu vo vzniku neuroblastómu, na čo nadviazala táto práca. Z 23 vzoriek, ktoré boli s touto diagnózou k dispozícii, nebola nepreukázaná očakávaná prítomnosť mutácie V600E v žiadnom z prípadov. Nepreukázanie pozitívneho výsledku je prikladané malému počtu vyšetrených vzoriek, naďalej je však predpokladaný podiel mutácie V600E na vzniku niektorých prípadov neuroblastómov. Na potvrdenie tohto predpokladu ďalej prebiehajú štúdie. Z doposiaľ vyšetrených pacientov, 91,3 % spĺňalo v dobe diagnostiky hranicu veku 4 roky, ktorú literatúra udáva až u 88 % prípadov neuroblastómu (Stephens a Aigner 2009). Najmladší pacient mal vek 0,05 rokov, nachádzal sa v štádiu 1 a podľa National Cancer Institute SEER programu z roku 1999 mal lepšiu prognózu na prežitie, a to z dôvodu diagnostiky ochorenia vo veku menej ako 1 rok, čo sa potvrdilo a pacient stále žije. Najstarší pacient mal 5,63 rokov, spadol do 4. klinického štádia a podľa údajov z programu SEER 1999 horšiu prognózu prežitia

kvôli stanoveniu diagnózy nad 5 rokov. Rovnako aj táto prognóza sa potvrdila, pacient je už po smrti.

Do skupiny pre detekciu mutácie V600E bolo zahrnutých aj 31 vzoriek meduloblastómu a to aj napriek tomu, že na prítomnosť *BRAF* mutácie v súvislosti s týmto nádorovým ochorením neboli publikované žiadne výsledky. Cieľom bolo zistiť možnú prítomnosť mutácie V600E génu *BRAF* v meduloblastóme ako jedného zo skupiny neuroektodermálnych nádorov. Všetky vyšetrené vzorky vykázali negatívny výsledok, čím tento predpoklad nebol potvrdený a nepodarilo sa preukázať novú skutočnosť v súvislosti s génom *BRAF* a príčinou tohto malígneho ochorenia.

Podobne ani u feochromocytómu, ktorý nepatrí medzi nádory CNS, nebola, napriek najväčšiemu počtu vzoriek – 47, preukázaná prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF*. V prípade vzniku tohto ochorenia bolo doposiaľ preukázaných 18 génov (Vícha a kol. 2013), ktoré sa na ňom podieľajú. Jochmanová a kol. v roku 2014 potvrdili prítomnosť mutácií, okrem iných, v onkogénoch *K-RAS* a *H-RAS*, ktoré sú súčasťou signálnej dráhy MAPK, rovnako ako gén *BRAF*. Aj na základe tejto skutočnosti bolo cieľom práce overiť možný výskyt mutácie V600E v prípade feochromocytómu, čo sa nepodarilo.

V roku 2012 Myung a kol. vykonali štúdiu zameranú na prítomnosť mutácie V600E génu *BRAF* u 223 vzoriek nádorov CNS (astrocytóm, ganglioglióm, glioblastóm, xantoastrocytóm a oligodendrocytóm). Potvrdili prítomnosť tejto mutácie v 36 prípadoch (16,1 %), pričom najväčší výskyt bol zaznamenaný u gangliogliómu (23,5 %) a astrocytómu s WHO stupňom malignity I (15,6 %). Sledovaná vzorka pre túto diplomovú prácu obsahovala 29 pacientov, z čoho bolo 21 astrocytómov, 4 glioblastómy a 4 gangliogliomy. Pomocou molekulárno – cytogenetickej metódy MLPA s použitím komerčného kitu P370 bola u dvoch pacientoch (6,8 %) potvrdená prítomnosť očakávanej mutácie *BRAF* V600E. Obaja pacienti mali diagnostikovaný astrocytóm (2/21, 9,5 %), jeden muž a jedna žena. Pacientka mala stanovený pilocytický astrocytóm, teda WHO *grade* I, čo zodpovedá tvrdeniam štúdií (Dougherty a kol. 2010, Schindler a kol. 2011, Myung a kol. 2012) o výskyte mutácie *BRAF* génu u nízkych *gradov* (WHO I a II) astrocytómu. Naopak, pacient s pozitívnou mutáciou V600E túto skutočnosť vyvracia, pretože má stanovený WHO stupeň malignity III. U ostatných typov vyšetrených nádorov CNS nebola potvrdená prítomnosť očakávanej mutácie, čo je pripisované nízkemu počtu vyšetrených pacientov. V prípade rozšírenia množstva vzoriek však pretrváva predpoklad prítomnosti

viacerých pozitívnych prípadov. Keďže bol na detekciu použitý komerčný kit P370, ktorý je navrhnutý aj na zachytenie tandemovej duplikácie 7q34 zahrňujúcu gén *KIAA1549* (exóny 19, 17, 11, 4) a gén *BRAF* (exóny 17, 14, 12, 8, 4), dôsledkom ktorej je fúzia *BRAF-KIAA1549*, bol podaný nepriamy dôkaz prítomnosti tejto fúzie. Prítomnosť tejto fúzie bola preukázaná v 60 – 80 % pilocytického astrocytómu (Jones a kol. 2009, Dahiya a kol. 2012). V tejto práci bola prítomnosť získavej mutácie 7q34 potvrdená u 5 (23,8 %) prípadov astrocytómu, z čoho 4 mali stupeň malignity I a jeden *grade* II, čo potvrdilo tvrdenia o výskyte u nízkych štádií ochorenia. Tri glioblastómy s *gradom* IV a jeden gangliogliom s *gradom* I taktiež vykázal získavú mutáciu 7q34. Tieto zistenia však neboli predmetom záujmu a primárnym cieľom tejto práce a bližšie sa na ne zamerala iná, momentálne prebiehajúca štúdia, ktorej sa osobne nezúčastňujem.

Ďalším cieľom tejto práce bolo preukázanie mutácie v géne *ALK* so zameraním na exóny 23 a 25. Viaceré štúdie sa v posledných rokoch sústredili na *ALK* mutácie ako jednu z možných príčin vzniku a vývoja neuroblastómu. V roku 2008 Chen a kol. vyšetrili 215 pacientov s týmto tumorom, pričom preukázali *missense* mutácie *ALK* génu v 13 prípadoch (6,1 %). Všetci pozitívni pacienti sa nachádzali v 3. – 4. štádiu ochorenia a mutácie, ktoré sa všetky nachádzali v kinázovej doméne, zabezpečili zvýšenie kinázovej aktivity. Iná štúdia, ktorú paralelne s vyššie spomenutou vykonal George a kol. v roku 2008, vykázala prítomnosť *ALK* mutácie u 7 z 93 vzoriek (8 %), pričom 4 zo 7 pozitívnych (57,1 %) mali substitučnú mutáciu F1174L. Pre túto štúdiu boli vybrané vzorky s potvrdenou prítomnosťou *MYCN* amplifikácie, čo podľa klasifikácie Brodeura z roku 1997 identifikuje vysoké štádium ochorenia (štádium 3 a 4). Na základe uvedených štúdií boli vymedzené hotspotové mutačné miesta R1275Q (kodón 1275 v exóne 25) a F1174L (kodón 1174 v exóne 23). Práve substitučná mutácia F1174L, ktorá zamieňa fenylalanín za leucín, sa v spoločnom výskyte s *MYCN* amplifikáciou ukazuje ako veľmi zlý prognostický faktor a príčina urýchlenia nástupu a priebehu ochorenia. Greengard a kol. v roku 2010 zhrnuli dáta z dovtedy vykonaných prác na detekciu mutácií génu *ALK* a stanovili incidenciu ich výskytu na 6 – 12 %. V tejto práci vykazujem výsledok z priamej sekvenácie zo 7 vyšetrených prípadov neuroblastómov, vybraných na základe potvrdenia prítomnosti amplifikácie *MYCN* metódou FISH. U jedného pacienta mužského pohlavia bol potvrdený predpoklad preukázaním pozitívneho výsledku na prítomnosť mutácie v exóne 23 (c.3522C>A p.F1174L). V percentuálnom vyjadrení je to 14,2 %, čo

prevyšuje percento incidencie udávané vo vyššie uvedených prácach. Tento rozdiel odôvodňujem malým počtom testovaných vzoriek. Rovnaký pacient bol testovaný aj na prítomnosť mutácie V600E *BRAF* génu, ktorá ale nebola nepreukázaná. Tento výsledok potvrdzuje tvrdenie Shukla a kol. z roku 2011, hovoriace o prítomnosti mutácie *BRAF* len v prípade, že nie je prítomná mutácia *ALK*. Keďže táto časť práce je súčasťou medzinárodnej štúdie (SIOPEN Biology group study – the determination of genomic *ALK* status in NB), ktorá ešte nie je ukončená, ďalšie výsledky v rámci tejto diplomovej práce nemohli byť zverejnené.

Na trhu existuje už viacero inhibítorov zameraných na onkogénne aktívny *ALK*, ktoré sú zatiaľ v predklinickom štádiu s výnimkou jedného, s názvom Crizotinib. Crizotinib je malá molekula pôsobiaca ako inhibítor fosforylácie *ALK* kinázovej domény a jeho onkogénnej, permanentne fosforylovanej varianty (Hy a kol. 2007). The U.S. Food and Drug Administration (FDA) dňa 26. augusta v roku 2011 schválila Crizotinib na liečbu pacientov s NSCLC vo vysokom štádiu ochorenia (lokálne pokročilé alebo metastatické štádium), ktorí vykazujú mutáciu v *ALK* géne. Toto schválenie prijalo v súvislosti s NSCLC, okrem Spojených Štátov, aj niekoľko ďalších krajín. V súčasnosti sa testovanie účinnosti tohto inhibítora sústreďuje aj na iné typy nádorov, zahŕňajúc neuroblastóm, ktorý je súčasťou medzinárodnej štúdie pod ktorú táto časť diplomovej práce spadá. Po potvrdení pozitívneho výsledku prítomnosti mutácie F1174L v prípade pacienta č.7, mu bola nasadená liečba Crizotinibom, pričom pacient bol už v dobe 2. relapsu a bola vyčerpaná štandardná protokolárna liečba. Ako udáva Hy a kol. (2007), účinok tohto inhibítora bol malý, v prípade výskytu mutácie F1174L u NSCLC, čo sa potvrdilo aj v prípade pacienta č.7 s neuroblastómom, kedy liečba Crizotinibom nezabrala a pacient je momentálne v poslednej fáze ochorenia, v štádiu umierania. Potvrdzuje to aj tvrdenia práce z roku 2009 (Wood a kol.), ktoré hovoria o ukazujúcej sa účinnosti inhibítora Crizotinib u neuroblastómu, v prípade výskytu mutácie *ALK* génu v mutačnom mieste R1275Q. Je potrebné podrobnejšie preskúmanie jednotlivých kritérií a účinnosti *ALK* inhibítorov, ako potenciálny prostriedok liečby u vybraných typov nádorov. Je však potrebné rátať s pravdepodobnosťou vytvorenia rezistencie voči týmto liečivám, z dôvodu predpokladu objavenia nových bodových mutácií v *ALK* kinázovej doméne.

K výberu posledného génu - β -katenínu (*CTNNB1*) pre diplomovú prácu viedli viaceré štúdie vykonané v súvislosti s meduloblastómom.

V roku 1998 Zurawell a kol. preukázali prítomnosť mutácie *β-katenínu* v 4,5 % prípadov (3 zo 67 vzoriek). Huang a kol. v roku 2000 v ďalšej štúdii na detekciu mutácie *β-katenínu* u sporadického meduloblastómu, potvrdili výskyt v prípade 4 zo 46 vyšetrených pacientov (8,6 %), pričom sa vyskytovali najmä u detí mladších ako 16 rokov. Následné práce potvrdzovali tieto tvrdenia a priniesli aj nové skutočnosti. Fattet a kol. v roku 2009 vyšetřili 72 pacientov s diagnostikovaným meduloblastómom a u 6 z nich (8,3 %) preukázali mutáciu *β-katenínu*. U 5 pacientov s pozitívnym výsledkom zároveň detegovali deléciu chromozómu 6, čo bolo zaujímavým zistením, rovnako ako to, že všetci pacienti patrili do skupiny 1 a 2 (WHO klasifikácia).

Skupinu pacientov pre túto prácu tvorilo 6 pacientov s diagnostikovaným meduloblastómom. Vybraní pacienti spadali do skupiny meduloblastómov I (Wnt skupina) podľa molekulárne - genetického rozdelenia, ktoré v roku 2011 zaviedol Taylor a kol. Táto skupina sa vyznačuje veľmi dobrou prognózou a radí sa sem klasický a desmoplastický meduloblastóm (1. a 2. skupina podľa histopatologického typu nádoru), čo pacienti v tejto vzorke spĺňali. Zaradenie do skupiny Wnt, a tým určenie pre priamu sekvenáciu na dôkaz prítomnosti mutácie *β-katenínu*, bolo vykonané na základe preukázanej delécie chromozómu 6 a neamplifikovaného *MYCN* onkogénu. Potvrdenie týchto dvoch faktorov bolo vykonané pomocou metódy FISH a MLPA. Rozsah sledovaného úseku bol stanovený od exónu 2 po exón 4. Dôvodom bol najčastejší, doposiaľ zistený, výskyt mutácií v exóne 3 v spojitosti s nádorovými ochoreniami (Morin a kol. 1997). Hoci bol, na základe vyššie uvedených faktov (monozómia 6 a neamplifikovaný *MYCN*), predpokladaný výskyt mutácie *β-katenínu* u všetkých vyšetrených vzoriek (6), pozitívny výsledok bol preukázaný v 4 z nich (66,6 %). Podobný výsledok dosiahol Robinson a kol. v roku 2012, kedy osekvenovali 11 pacientov zo skupiny Wnt meduloblastómov a preukázali prítomnosť mutácie *β-katenínu* v 7 prípadoch (72,7 %). V porovnaní s týmito výsledkami a výsledkami Fattet a kol. (2009), ktoré vykázali incidenciu mutácie *β-katenínu* 83,3 % v prípade prítomnosti monozómie 6, bola v rámci diplomovej práce dosiahnutá nižšia hodnota. Dôvodom by mohla byť chyba pri sekvenovaní, ktorú je potrebné overiť opakovaným testovaním dvoch negatívnych vzoriek. V prípade pozitívnych výsledkov bola u jedného pacienta detegovaná mutácia v kodóne 34 a zapríčinila zámenu glycínu za valín (p.G34V) a u dvoch mutácia v kodóne 33, ktorá vedie k substitúcii serínu za fenylalanín (p. S33F). U jedného

pacienta bola zistená prítomnosť mutácií v oboch kodónoch 33 a 37. Tieto výsledky prispeli k úvahám vyššie uvedených štúdií (Zurawell a kol. 1998, Huang a kol. 2000) o kodónoch 33 a 37 ako o hotspotoch pre gén *β-katenín*.

β-katenín sa ako súčasť Wnt signálnej dráhy javí ako sľubný cieľ therapeutickej liečby vybraných nádorových ochorení, vrátane meduloblastómu. Je dôležité určenie špecifickosti jednotlivých skupín tohto tumoru (molekulárne - biologické prognostické faktory) a tým uľahčenie výberu správnej liečby jednotlivých pacientov. *β-katenín*, ktorý sa medzi potenciálne prognostické ukazovatele radí, bol preto predmetom záujmu tejto práce, rovnako ako ostatné 2 gény *BRAF* a *ALK*.

8. Súhrn

- Pomocou molekulárno – genetických metód bolo vyšetrených celkom 133 vzoriek pochádzajúcich od pacientov s diagnostikovaným neuroektodermálnym nádorom s cieľom detekcie somatických mutácií u génov *ALK*, *BRAF* a *β-katenín* (*CTNNB1*).
- Na prítomnosť mutácie V600E génu *BRAF* (exón 15) bolo metódou priamej sekvenácie vyšetrených 23 vzoriek neuroblastómu, 31 vzoriek meduloblastómu a 47 vzoriek feochromocytómu, pričom všetky vykazovali negatívny výsledok a nebol tak potvrdený predpoklad o výskyte mutácie V600E v prípade týchto nádorov. V prípade 29 vzoriek nádorov mozgu: 21 astrocytómov, 4 glioblastómy a 4 gangliogliomy, bola metódou MLPA preukázaná mutácia V600E v prípade 2 vzoriek astrocytómu, čo tvrdenie, vyjadrené v úvode práce, potvrdzuje.
- 7 vybraných pacientov s diagnostikovaným neuroblastómom (štádium 3 a 4) bolo priamou sekvenáciou testovaných na prítomnosť mutácie *ALK* génu, so zameraním na exóny 23 a 25, pričom u jedného pacienta bol predpoklad pozitívneho výsledku potvrdený, a to preukázaním mutácie F114L v exóne 23.
- Zo skupiny vzoriek meduloblastómu bolo vyselektovaných 6, ktoré sa radili do Wnt skupiny (na základe preukázanej monozómie 6), a boli metódou priamej sekvenácie vyšetrené na dôkaz prítomnosti mutácie v géne *β-katenín* so zameraním na exóny 2-4. Pozitívny výsledok bol preukázaný v 4 prípadoch v kodónoch 33, 34 a 37, čím bola potvrdená hypotéza o spoločnom výskyte delécie chromozómu 6 a mutácie *β-katenínu*.
- Práca mala svojimi výsledkami pomôcť k identifikácii študovaných génov a ich mutácií ako prognostických ukazovateľov klasifikácie vybraných typov nádorov a tým prispieť k zavedeniu vhodnejšej liečby, založenej na inhibícii mutovaných génov. Výsledky tejto práce nepreukázali zvýšenú incidenciu *BRAF* mutácie u FEO/PARA, nebudú sa teda môcť využiť *BRAF* inhibítory k liečbe týchto ochorení. Naopak bola preukázaná Wnt aktivácia u pacientov s meduloblastómom, ktorí, podľa predpokladu, prežívajú v dobrom klinickom stave, čo vedie k možnosti zníženia intenzity terapie, predovšetkým obmedzenia rádioterapie u týchto pacientov. *ALK* mutácia sa javí ako veľmi vhodný terapeutický cieľ, ale bude vyžadovať zhodnotenie celoeurópskej štúdie, vzhľadom k nízkej incidencii mutácie.

9. Literatúra

1. Allouche, M. (2010): ALK (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 14: 1059-64.
2. Ambros, P.F., Ambros, M., Brouder, G.M., Haber, M., Khan, J., Nakagawara, A., Schleiermacher, G., Speleman, F., Spitz, R., London, W.B., Cohn, S.L. a kol. (2009): International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Journal of Cancer* 100: 1471-82.
3. Azarova, A.M., Gautam, G., George, R.E (2011): Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Seminars in cancer biology* 21: 267-275.
4. Balmanno, K., Cook, S.J. (2009): Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 16: 368-77.
5. Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmeier, W. (1996): Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638-42.
6. Blumer, K. J. and Johnson, C. L (1994): Diversity in function and regulation of MAP kinase pathway. *Trends Biochem. Sci.* 19: 236-240.
7. Braun, B.S., Shannon, K. (2008): Targeting Ras in myeloid leukemias. *Clin Cancer Res.* 14: 2249-52.
8. Brodeur, G.M., Castleberry, R.P. (1997): Neuroblastoma. In: Pizzo, P.A., Poplack, D.G.: *Principles and practice of pediatric oncology*, 3th edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 761-97.
9. Brodeur, G.M., Maris, J.M., Yamashiro, D.J., Hogarty, M.D, White, P.S. (1997): Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol.*19: 93-101.
10. Brouwers, F.M., Eisenhofer, G., Tao, J.J., Kant, J.A., Adams, K.T. Linehan, W.M., Pacak, K. (2006): High frequency of SDHB germline mutations in patients with malignant catecholamine-producing paragangliomas: implications for genetic testing. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4505-9.
11. Burnichon, N., Vescovo, L., Amar, L., Libe, R., de Reynies, A., Venisse, A., Jouanno, E., Laurendeau, I., Parfait, B., Bertherat, J. a kol. (2011): Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Human Molecular Genetics* 20: 3974–85.
12. Clevers, H. (2006): Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469–80.
13. Curia, M.C., Zuckermann, M., De Lellis, L., Catalano, T., Lattanzio, R., Aceto, G., Veschi, S., Cama, A., Otte, J.B., Piantelli, M., Mariani-Costantini, R., Cetta, F., Battista, P. (2008): Sporadic childhood hepatoblastomas show activation of beta-catenin, mismatch repair defects and p53 mutations. *Mod Pathol.* 21: 7-14.
14. Dahiya, S., Yu, J., Kaul, A., Leonard, J.R., Gutmann, D.H. (2012): Novel BRAF Alteration in a Sporadic Pilocytic Astrocytoma. *Case Rep Med* 2012: 1-4.
15. Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., a kol. (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-54.

16. De Brouwer, S., De Preter, K., Kumps, C., Zabrocki, P., Porcu, M., Westerhout, E.M., Lakeman, A., Vandesompele, J., Hoebeek, J., Van Maerken, T. a kol. (2011): Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res.* 16: 4353–62.
17. De Ligt, J., Willemsen, M. H., van Bon, B. W. M., Kleefstra, T., Yntema, H. G., Kroes, T., Vulto-van Silfhout, A. T., Koolen, D. A., de Vries, P., Gilissen, C. a kol. (2012): Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *New Eng. J. Med.* 367: 1921-9.
18. Dougherty MJ, Santi M, Brose MS, Ma, C., Resnick, A.C., Sievert, A.J., Storm, P.B., Biegel, J.A. (2010): Activating mutations in *BRAF* characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro. Oncol.* 12: 621–30.
19. Dreyfuss, J.M., Johnson, M.D., Park, P.J. (2009): Meta-analysis of glioblastoma multiforme versus anaplastic astrocytoma identifies robust gene markers. *Mol Cancer* 8: 71.
20. Eychene, A., Barnier, J. V., Apiou, F., Dutrillaux, B., Calothy, G. (1992): Chromosomal assignment of two human B-raf(Rml) proto-oncogene loci: B-raf-1 encoding the p94(Braf/Rml) and B-raf-2, a processed pseudogene. *Oncogene* 7: 1657-60.
21. Fattet, S., Haberler, C., Legoix, P., Varlet, P., Lellouch-Tubiana, A., Lair, S., Manie, E., Raquin, M.A., Bours, D., Carpentier, S. a kol. (2009): Beta-catenin status in paediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. *J Pathol* 218: 86-94.
22. George, R.E., Sanda, T., Hanna, M., Fröhling, S., Luther, W., Zhang, J., Ahn, Y., Zhou, W., London, W.B. a kol. (2008): Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 455: 975-8.
23. Grande, E., Bolós, M.V. and Arriola, E. (2011): Targeting Oncogenic ALK: A promising Strategy for Cancer Treatment *Mol Cancer Ther* 10: 569-79.
24. Greengard, E.G., Park, J.R. (2010): ALK-Related Neuroblastic Tumor Susceptibility. In: Pagon, R.A., Adam, M.P., Ardinger, H.H. a kol. (eds): *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle; Seattle (WA), 1993-2015.
25. He, X., Semenov, M., Tamai, K., Zeng, X. (2004): LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131: 1663–77.
26. Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.P., Nickerson, E., Auclair, D., Liren, L.I. a kol. (2012): A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* 150: 251-63.
27. Huang, H., Mahler-Araujo, B.M., Sankila, A., Chimelli, L., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. (2000): APC Mutations in Sporadic Medulloblastomas. *The American Journal of Pathology* 156: 433-7.
28. Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., Chakraborti, T. (2003): Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253: 269–85.
29. Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M. (2011): Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *The New England journal of medicine* 364: 2507-16.
30. Chappell, W.H., Steelman, L.S., Long, J.M., Kempf, R.C., Abrams, S.L, Franklin, R.A., Bäsecke, J., Stivala, F., Donia, M., Fagone, P., a kol. (2011): Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Inhibitors: Rationale and Importance to Inhibiting These Pathways in Human Health. *Oncotarget* 2: 135-64.

31. Chen, B., Dodge, M.E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C.W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N.S., a kol. (2009): Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nature chemical biology* 5: 100–107.
32. Chen, Y., Takita, J., Choi, Y. L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., Wang, L., Soda, M., Kikuchi, A., Igarashi, T., Nakagawara, A., Hayashi, Y., Mano, H., Ogawa, S. (2008): Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455: 971-974.
33. Cheung, N.K.V., Zhang, J., Lu, CH., Parker, M., Bahrami, A., Tickoo, S.K., Heguy, A., Pappo, A.S., Federico, S., Dalton, J. a kol. (2012): Association of Age at Diagnosis and Genetic Mutations inPatients with Neuroblastoma. *JAMA* 307: 1062-71.
34. Chung, E., Kondo, M. (2011): Role of Ras/Raf/MEK/ERK signaling in physiological hematopoiesis and leukemia development. *Immunol Res.* 49: 248-68.
35. Churácková, M. (2008): Nádory centrálního nervového systému u dětí a mladistvých. *Onkologie* 2: 234–38.
36. Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugieres, L., Ribeiro, A., de Pontual, L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., Valteau-Couanet, D., Frebourg, T., Michon, J., Lyonnet, S., Amiel, J., Delattre, O. (2008): Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455: 967-970.
37. Janoueix-Lerosey, I., Lequine, D., Brugières, L., Ribeiro,A., de Pontual, A.L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., a kol. (2008): Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455: 967-70.
38. Jochmanová, I.,Zelinka, T. , Widimský J., Pacak, K. (2014): HIF Signaling Pathway in Pheochromocytoma and Other Neuroendocrine Tumors. *Physiol. Res.* 63: 251-62.
39. Jones, D. T. W., Kocialkowski, S., Liu, L., Pearson, D. M., Ichimura, K., Collins, V. P. (2009): Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene* 28: 2119-23.
40. KARASEK, D., SHAH, U., FRYSAK, Z., STRATAKIS, C.A., PACAK, K. (2012): An update on the genetics of phaeochromocytoma. *J Hum Hypertens* 27: 141-47.
41. Kleihues, P., Cavenee, W.K. (2007): Pathology and genetics of tumors of the nervous system. Press, Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC).
42. Kleinschmidt, L. (2006) Principles of Cancer Biology. Benjamin Cummings, San Francisco.
43. Knight, T., Irving, J.A.E. (2014): Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. *Frontiers in Oncology* 4: 160.
44. Koesters, R., Hans, M.A., Benner, A., Prosst, R., Boehm, J., Gahlen, J., Doeberitz, M.V.K. (2001): Predominant mutation of codon 41 of the β -catenin proto-oncogene in rat colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine using a complete carcinogenic protocol. *Carcinogenesis* 22: 1885-90.
45. Koch, A., Denkhaus, D., Albrecht, S., Leuschner, I., von Schweinitz, D., Pietsch, T. (1999): Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the β -catenin gene. *Cancer Res.* 59: 269-73.
46. Lee, C.C., Jia, Y., Li, N., Sun, X., Ng, K., Ambing, E., Gao, M.Y., Hua, S., Chen, C., Kim, S., Michellys, P.Y., Lesley, S.A., Harris, J.L., Spraggon, G. (2010): Crystal structure of the ALK (anaplastic lymphoma kinase) catalytic domain. *Biochem J.* 430: 425-37.

47. Legoix, P., Bluteau, O., Bayer, J., Perret, C., Balabaud, C., Belghiti, J., Franco, D., Thomas, G., Laurent-Puig, P. Zucman-Rossi, J. (1999): Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. *Oncogene* 18: 4044-6.
48. Lepourcelet, M., Chen, Y.N., France, D.S., Wang, H., Crews, P., Petersen, F., Bruseo, C., Wood, A.W., Shivdasani, R.A. (2004): Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* 5: 91–102.
49. Liu, Z., Thiele, C.J. (2012): ALK and MYCN: when two oncogenes are better than one. *Cancer Cell* 21: 325-326.
50. Logan, C.Y., Nusse, R. (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20: 781–810.
51. Louis, D.N., Holland, E.C., Cairncross, J.G.(2001): Glioma Classification. *The American Journal of Pathology* 159: 779-786.
52. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P. (2007): WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* 114: 97-109.
53. MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X. (2009): Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* 17: 9-26.
54. Major, M.B., Camp, N.D., Berndt, J.D., Yi, X., Goldenberg, S.J., Hubbert, C., Biechele, T.L., Gingras, A.C., Zheng, N., Maccoss, M.J., Angers, S., Moon, R.T. (2007): Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* 316: 1043-6.
55. Maldonado, J.L., Fridlyand, J., Patel, H., Jain, A.N., Busam, K., Kageshita, T., Ono, T., Albertson, D.G. Pinkel, D., Bastian, B.C. (2003): Determinants of BRAF Mutations in Primary Melanomas. *J Natl Cancer Inst* 95: 1878-90.
56. Martinsson, T., Eriksson, T., Abrahamsson, J., Caren, H., Hansson, M., Kogner, P., Kamaraj, S., Schönherr, C., Weinmar, J., Ruuth, K., Palmer, R.H., Hallberg, B. (2011): Appearance of the novel activating F1174S ALK mutation in neuroblastoma correlates with aggressive tumor progression and unresponsiveness to therapy. *Cancer Res.* 71: 98-105.
57. Molenaar, J.J., Koster, J., Zwijnenburg, D.A., van Suis, P., Valentijn, L.J, van der Ploeg, I., Hamdi, M., van Nes, J., Westerman, B.A., van Arkel, J. a kol. (2012): Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* 483: 589-93.
58. Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275: 1787-90.
59. Murali, J., Bénard, A., Lourenço, F.C., Monnet, C., Greenland, C., Moog-Lutz, C., Racaud-Sultan, C., Gonzalez-Dunia, D., Vigny, M., Mehlen, P., Delsol, G., Allouche, M. (2006): Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 26: 6209-22.
60. Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., Polakis, P. (1995): Regulation of intracellular β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3046-50.
61. Myung, J. K., Cho, H., Park, C.K., Kim, S.K., Lee, S.H., Park, S.H. (2012): Analysis of the BRAFV600E Mutation in Central Nervous System Tumors. *Translational Oncology* 5: 430–436.

62. Namba, H., Nakashima, M., Hayashi, T., Hayashida, N., Maeda, S., Rogounovitch, T. I., Ohtsuru, A., Saenko, V. A., Kanematsu, T., Yamashita, S. (2003): Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J. Clin. Endocr. Metab.* 88: 4393-97.
63. Naoki, K., Chen, T.H., Richards, W.G., Sugarbaker, D.J., Meyerson, M. (2002): Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 62: 7001-3.
64. Neumann, H.P.H., Bausch, B., McWhinney, S.R., Bender, B.U., Gimm, O., Frankre, G., Schipper, J., Klisch, J., Althoefer, C., Zerres, K. (2002): Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *New Engl J Med* 346: 1459-66.
65. Nevšímalová, S., Růžicka, E., Tichý, J. (2002): *Neurologie*. 1.vyd. Galén, Praha.
66. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., Thompson, J., Thompson, M.W. (2004): *Klinická genetika: Thompson & Thompson* : 6. Vyd, Vyd. 1. Triton, Praha.
67. Opocher, G.; Schiavi, F. (2011): Functional consequences of succinate dehydrogenase mutations. *Endocr Pract* 3: 64-71.
68. Palmer, R.H., Verneris, E., Grabbe, C., Hallberg, B. (2009): Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J.* 420: 345–61.
69. Peifer, M. (1993): Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection. *Science* 262: 1667-8.
70. Pfister, S., Janzarik, W. G., Remke, M., Ernst, A., Werft, W., Becker, N., Toedt, G., Wittmann, A., Kratz, C., Olbrich, H., Ahmadi, R., Thieme, B., a kol. (2008): BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK activation in low-grade astrocytomas. *J. Clin. Invest.* 118: 1739-49.
71. Pfister, S., Remke, M., Benner, A., Menderzyk, F., Toedt, G., Felsberg, J., Wittmann, A., Devens, F., Gerber, N.U., Joos, S. a kol. (2009): Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci. *J Clin Oncol.* 27: 1627–36.
72. Poulikakos, P. I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K. M., Rosen, N. (2010): RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464: 427-30.
73. Prahallad, A., Sun, C., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Salazar, R., Zecchin, D., Beijersbergen, R. L., Bardelli, A., Bernards, R. (2012): Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483: 100-103.
74. Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Velculescu, V.E. (2002): Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418: 934.
75. Ries, L.A.G., Smith, M.A., Gurney, J.G., Linet, M., Tamra, T., Young, J.L., Bunin, G.R. (eds) (1999): *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD.
76. Roberts, P.J., Der, C.J. (2007): Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291-3310.
77. Robinson, G., Parker, M., Kranenburg, T.A., Lu, Ch., Chen, X., Ding, L., Phoenix, T.N., Hedlund, E., Wei, L., Zhu, X. a kol. (2012): Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature* 488: 43–48.
78. Rodríguez-Viciana, P., Tetsu, O., Tidyman, W.E., Estep, A.L., Conger, B.A., Santa Cruz, M., McCormick, F., Rauen, K.A. (2006): Germline Mutations in Genes Within the MAPK Pathway Cause Cardio-facio-cutaneous Syndrome. *Science* 311: 1287-90.

79. Roskoski, R. (2013): Anaplastic lymphoma kinase (ALK): Structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacological Research* 68: 68-94.
80. Rubinstein, J.C., Sznol, M., Pavlick, A.C., Ariyan, S., Cheng, E., Bacchiocchi, A., Kluger, H.M., Narayan, D., Halaban, R. (2010): Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *Journal of Translational Medicine* 8: 67.
81. Sarkozy, A., Carta, C., Moretti, S., Zampino, G., Digilio, M. C., Pantaleoni, F., Scioletti, A. P., Esposito, G., Cordeddu, V., Lepri, F., Petrangeli, V., Dentici, M. L., a kol. (2009): Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum. Mutat.* 30: 695-702.
82. Shukla, N., Ameer, N., Yilmaz, I., Nafa, K., Lau, Ch.Y., Marchetti, A., Borsu, L., Barr, F.G., Ladanyi, M. (2012): Oncogene Mutation Profiling of Pediatric Solid Tumors Reveals Significant Subsets of Embryonal Rhabdomyosarcoma and Neuroblastoma with Mutated Genes in Growth Signaling Pathways. *Clin Cancer* 18: 748-57.
83. Schindler, G., Capper, D., Meyer, J., Janzarik, W., Omran, H., Herold-Mende, Ch., Schmieder, K., Wesseling, P., Mawrin, Ch. a kol. (2011): Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 121: 397–405.
84. Sithanandam, G., Kolch, W., Duh, F.M., Rapp, U.R. (1990): Complete coding sequence of human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies. *Oncogenes* 5:1775-80.
85. Smith, M.A., Altekruse, S.F., Adamson, P.C., Reaman, G.H., Seibel, N.L. (2014): Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer* 120: 2497-506.
86. Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y., Mano, H. (2007): Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448: 561–6.
87. Solit, D. B., Garraway, L. A., Pratilas, C. A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J. M., She, Y., Osman, I., Golub, T. R., Sebolt-Leopold, J., Sellers, W. R., Rosen, N. (2006): BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 439: 358-62.
88. Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1998): Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 1130-4.
89. Stephens, O.F., Aigner, K.R. (2009): Basic of oncology. Springer, New York.
90. Stoica, G.E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D.J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A.T., Wellstein, A. (2001): Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem* 276: 16772-9.
91. Stoica, G.E., Kuo, A., Powers, C., Bowden, E.T., Sale, E.B., Riegel, A.T., Wellstein, A. (2002): Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem* 277: 35990-8.
92. Taylor, M.D., Northcott, P.A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y.J., Clifford, S.C., Eberhart, CH.G., Parsons, D.W., Rutkowski, S. a kol.(2011): Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathologica* 123: 465-72.
93. Tol, J., Nagtegaal, I. D., Punt, C. J. A. (2009): BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. (Letter) *New Eng. J. Med.* 361: 98-9.

94. Udatsu, Y., Kusafuka, T., Kuroda, S., Miao, J., Okada, A. (2001): High frequency of β -catenin mutations in hepatoblastoma. *Pediatr. Surg. Int.* 17: 508-12.
95. Venesio, T., Balsamo, A., Errichiello, E., Ranzani, G.N., Risio, M. (2013): Oxidative DNA damage drives carcinogenesis in MUTYH-associated-polyposis by specific mutations of mitochondrial and MAPK genes. *Modern Pathology* 26: 1371-1381.
96. Vetter, I.R., Wittinghofer, A. (2001): The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294: 1299-304.
97. Vícha, A., Musil, Z., Pacak K. (2013): Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma syndromes: new advances and future treatment options. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* 20: 186-191.
98. Vícha, A.; Eckschlager T. (2008): Využití MLPA techniky k průkazu genetických změn u neuroblastomu. *Klinická onkologie* 21: 149-53.
99. Wan, P.T.C, Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Cancer Genome Project, Jones, C.M., Marshall, C.H.J., a kol. (2004): Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* 116: 855-67.
100. Welander, J., Larsson, C., Backdahl, M., Hareni, N., Sivler, T., Brauckhoff, M., Soderkvist, P., Gimm, O. (2012): Integrative genomics reveals frequent somatic NF1 mutations in sporadic pheochromocytomas. *Human Molecular Genetics* 21: 5406–16.
101. Wood, A.C., Laudenslager, M., Haglund, E.A., Attiyeh, E.F., Pawel, B., Courtright, J., Plegaria, J., Christensen, J.G., Maris, J.M., Mosse, Y.P. (2009): Inhibition of ALK mutated neuroblastomas by the selective inhibitor PF-02341066. *J Clin Oncol* 27: 15.
102. Yu, J., Deshmukh, H., Gutmann, R. J., Emnett, R. J., Rodriguez, F. J., Watson, M. A., Nagarajan, R., Gutmann, D. H. (2009): Alterations of BRAF and HIPK2 loci predominate in sporadic pilocytic astrocytoma. *Neurology* 73: 1526-31.
103. Zelinka, T., Eisenhofer, G., Pacák, K. (2007): Pheochromocytoma as a catecholamine producing tumor: Implications for clinical practice. *Stress* 10: 195–203.
104. Zhang, Y., Appleton, B.A., Wiesmann, C., Lau, T., Costa, M., Hannoush, R.N., Sidhu, S.S. (2009): Inhibition of Wnt signaling by Dishevelled PDZ peptides. *Nature chemical biology* 5:217–19.
105. Zitterbart, K., Pavelka, Z., Zitterbartová, J. (2010): Meduloblastom: nejčastější zhoubný nádor mozku u dětí. *Onkologie* 4: 256–9.
106. Zou, H.Y., Li, Q., Lee, J.H., Arango, M.E., McDonnell, S.R., Yamazaki, S., Koudriakova, T.B., Alton, G., Ciu, J.J., Kung, P.P. a kol. (2007): An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* 67: 4408.
107. Zurawel, R.H., Chiappa, S.A., Allen, C., Raffel, C. (1998): Sporadic medulloblastomas contain oncogenic β -catenin mutations. *Cancer Res* 58: 896-9.

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 14.08.2015

.....

Podpis

Podakovanie:

V prvom rade by som chcela poďakovať môjmu školiteľovi MUDr. Alešovi Víchovi, Ph.D., pod ktorého vedením som túto prácu vypracovávala, za jeho vedenie, trpezlivosť, rady a pomoc, ktorú mi poskytol počas doby písania. Ďakujem tiež pracovníkom laboratória na Klinike detskej hematológie a onkológie UK 2. LF a FN Motol za pomoc pri vykonávaní praktickej časti práce. Veľká vďaka patrí mojim rodičom za podporu a trpezlivosť počas celej doby štúdia.

Abstrakt

Diplomová práca bola zameraná na dôkaz vybraných somatických mutácií u génov *ALK* (Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase), *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) a *β-katenín* (*CTNNB1*) prostredníctvom molekulárno - genetických metód v cieľovej skupine neuroektodermálnych nádorov (neuroblastóm, meduloblastóm, nádory mozgu, paragangliom a feochromocytóm). Niektoré z nich sú už považované za prognostické ukazovatele, ktoré napomáhajú určiť podtyp jednotlivých malignít a na základe tejto molekulárno – biologickej klasifikácie výber správnej liečby. Pre analýzu bol použitý genetický materiál od 133 pacientov, rozdelený podľa typu nádorového ochorenia. Prítomnosť mutácie bola detegovaná v siedmych prípadoch, z čoho 2 prislúchali génu *BRAF*, 1 génu *ALK* a 4 génu *β-katenín*. U jednotlivých génov boli predmetom skúmania hotspotové mutačné miesta, pričom cieľom bolo potvrdiť prítomnosť mutácií v nich a prispieť tým k štúdiám zameraným na zavedenie vhodnejšej liečby pomocou inhibítorov mutovaných génov.

Kľúčové slová: *ALK*, *BRAF*, *β-katenín* (*CTNNB1*), neuroektodermálne nádory, sekvenácia, MLPA

Abstract

The diploma thesis was focused on evidence of selected somatic mutations in genes *ALK* (Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase), *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) and *β-catenin* (*CTNNB1*) through molecular - genetic methods in the target group of neuroectodermal tumors (neuroblastoma, medulloblastoma, brain tumors, paraganglioma and pheochromocytoma). Some of them are already considered as prognostic indicators which help to identify the subtype of various tumors and on the basis of this molecular - biological classification choosing the appropriate treatment. The genetic material of 133 patients was used for the analysis divided by the type of cancer. The presence of the mutation was detected in seven cases, of which two of them belonged to the gene *BRAF*, one to the gene *ALK* and four to the gene *β-catenin*. The subject of research in the cases of this genes were hotspot mutation sites. The purpose was to confirm the presence of the mutation in the hotspots and contribute to the studies which are aimed at the introduction of more suitable treatment through the inhibitors of mutated genes.

Keywords: *ALK*, *BRAF*, *β-catenin* (*CTNNB1*), neuroectodermal tumors, sequencing, MLPA

Obsah

1. Zoznam skratiek	7
2. Úvod	8
3. Ciele práce	10
Hypotézy	10
4. Prehľad literatúry	11
4.1. Nádory	11
4.2. Nádory CNS u detí a mladistvých	11
4.2.1 Gliómy	13
4.2.1.1. Astrocytóm	14
4.2.2 Embryonálne nádory	15
4.2.2.1. Meduloblastóm	15
4.2.3 Neuroblastóm	17
4.2.4 Feochromocytóm	18
4.3. Študované gény	19
4.3.1 β -katenín (CTNNB1)	19
4.3.1.1. Wnt/ β -katenín signálna dráha	21
4.3.1.2. β -katenín a nádorové ochorenia	23
4.3.2 BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)	25
4.3.2.1. MAPK/ERK signálna dráha	26
4.3.2.2. BRAF a ochorenia	28
4.3.3 ALK (Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase)	30
4.3.3.1. ALK a nádorové ochorenia	32
4.3.3.2. ALK a neuroblastóm	33
5. Materiál a metódy	35
5.1. Materiál použitý na analýzu	35
5.2. Izolácia DNA z tkanív (Purgene)	36
5.3. Sekvenovanie	37
5.3.1 PCR reakcia	37
5.3.2 Elektroforéza	38
5.3.3 Sekvenačná PCR	39
5.3.4 Čistenie po sekvenačnej PCR	40
5.3.5 Príprava vzorky na fragmentačnú analýzu	41
5.3.6 Kapilárna elektroforéza a analýza	41
5.4. MLPA	41
5.4.1 DNA denaturácia a hybridizácia Salsa prób (1. deň)	41
5.4.2 Ligačná reakcia (2. deň)	42

5.4.3 PCR reakcia (2. deň)	43
5.4.4 Príprava vzorky na fragmentačnú analýzu (2. deň).....	43
5.4.5 Kapilárna elektroforéza a analýza	44
6. Výsledky.....	45
6.1. Detekcia mutácie BRAF génu.....	45
6.1.1 Pacienti s neuroblastómom	46
6.1.2 Pacienti s meduloblastómom.....	47
6.1.3 Pacienti s feochromocytómom.....	49
6.1.4 Pacienti s nádorom mozgu	50
6.2. Detekcia mutácie ALK génu sekvenovaním	52
6.3. Detekcia mutácie génu β -katenín sekvenovaním.....	54
7. Diskusia	57
8. Súhrn	64
9. Literatúra.....	65

1. Zoznam skratiek

ALK	Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CDK	cyklín dependentná kináza (cyclin dependent kinase)
CK1	kazeín kináza 1 (Casein Kinase 1)
CNS	centrálna nervová sústava
DSH	Dishewelled
EGF	epidermálny rastový faktor (Epidermal Growth Factor)
EtBr	ethidium bromid
EtOH	etanol
EX	exón
FP	priamy <i>primer</i> (Forward Primer)
F	žena (Female)
FAP	familiárna adenomatózna polypóza (Familial Adenomatous Polyposis)
FEO	feochromocytóm
FGF	fibroblastový rastový faktor (Fibroblast Growth Factor)
FISH	fluorescenčná in situ hybridizácia (Fluorescence In Situ Hybridisation)
Fz	Frizzled
GSK3	glykogén syntáza kináza 3 (Glycogen Synthase Kinase 3)
HDAC	histondeacetyláza
HR	nádor vysokého rizika (High Risk)
IDH	Isocitrate Dehydrogenase
INSS	The International Neuroblastoma Staging System
LOH	strata heterozygoty (Loss of Heterozygosity)
LR	nádor nízkeho rizika (Low Risk)
M	muž (male)
MAPK	mitózu aktivujúca proteín kináza (Mitotic Activated Protein Kinase)
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MEN	syndróm endokrinnnej neoplázie (Multiple Endocrine Neoplasie)
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MYCN	V-Myc Avian Myelomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma
NaOAc	acetát sodný
NF1	neurofibromin 1
NSCLC	nemalobunečný karcinóm pľúc (Non-small Cell Lung Cancer)
PARA	paragangliom
PDGF	Platelet-Derivate Growth Factor
PNET	primitívny neuroektodermálny nádor (primitive neuroectodermal tumor)
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTCH	Patched 1
RP	reverzný <i>primer</i> (Reverse Primer)
RAS	Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
Rb	retinoblastoma
RTK	receptor tyrozín kináza (Receptor Tyrosin Kinase)
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SH3	Src homológna doména 3 (Src homology-3)
SHH	Sonic Hedgehog signálna dráha
SR	nádor stredného rizika (Standard Risk)
TP53	tumor proteín p53 (tumor protein p53)
VEGF	vaskulárny endoteliálny rastový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)
VHL	Von Hippel-Lindau syndróm
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia (World Health Organization)
WNT	signálna dráha Wingless Integration

2. Úvod

Vznik zhubného nádorového ochorenia je dôsledkom narušenia kontroly delenia, prežívania a rastu buniek. Jednou z hlavných príčin tumorgenézy (malígnej transformácie buniek) sú somatické mutácie génov, ktoré kódujú rastové faktory a proteín kinázy. Produkty týchto génov sú súčasťou základných signálnych dráh zabezpečujúcich reguláciu životne dôležitých bunkových procesov a zmenami na úrovni DNA (mutáciami) dochádza k narušeniu stabilných funkcií. Mnohé zo zmien u týchto génov sú špecifické pre konkrétne typy malignít a stali sa ich prognostickými ukazovateľmi.

Táto práca je zameraná na nádory vzniknuté z neuroektodermy, konkrétne neuroblastóm, meduloblastóm, nádory mozgu a feochromocytóm. Cieľom záujmu boli 3 gény, konkrétne detekcia a dôkaz vybraných somatických mutácií v génoch *ALK*, *BRAF* a *β -katenín*.

ALK gén (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase) kóduje produkt, ktorý patrí do skupiny tyrozín kináz, konkrétne podskupiny inzulínových receptorov. Kódovaný proteín vykazuje tkanivovo špecifickú expresiu a to predovšetkým v mozgu, ale tiež v čreve a semenníkoch. Výrazne teda ovplyvňuje procesy spojené s vývojom mozgu a špecifických neurónov v nervovej sústave. V spojitosti s neuroblastómom boli detegované chromozómové prestavby, konkrétne translokácie *ALK* génu s rôznymi fúznymi partnermi, ktoré následne viedli k overexpresii. Častejšie sa však objavili bodové mutácie a amplifikácie. Zaujímavé bolo zistenie, že prítomná amplifikácia *ALK* génu u neuroblastómov je väčšinou asociovaná s amplifikáciou *MYCN* onkogénu, s ktorým leží na krátkom ramienku chromozómu dva (Ambros a kol. 2009). Výskyt tejto spoločnej amplifikácie bol detegovaný u vysoko rizikovej skupiny pacientov a je považovaná za identifikačný znak tejto skupiny. V prípade sporadického neuroblastómu boli mutácie *ALK* génu preukázané s incidenciou 6 – 12 % (Greengard a kol. 2010).

Ďalší z génov asociovaných s tumorigenézou je gén *BRAF* (v-raf murin sarcoma viral oncogene homolog B1). Kóduje proteín z početnej rodiny raf serin/threoninových kináz, ktorý zohráva dôležitú úlohu v regulácii signálnej dráhy MAPK/ERK ovplyvňujúcu bunkové delenie, diferenciáciu, sekréciu a apoptózu. *Missense* mutácie v tomto géne sa vyskytujú v rôznych typoch nádorových ochorení,

akými sú predovšetkým malígnym melanóm (až 66 %), ale tiež v malom percente kolorektálneho karcinómu, karcinómu pľúc a iných. Najčastejšie sa vyskytujúcou mutáciou, z vyše 40-tich objavených, je transverzia v exóne 16 v kodóne 600 (V600E), ktorá zamieňa valín za kyselinu glutámovú, čím prepožičiava bunkám transformačnú aktivitu. Takto je zabezpečený permanentne aktívny stav proteínu B-raf, teda zvýšená kinázová aktivita a to nezávisle na signalizácii RAS proteínu (Davies a kol. 2002). Hoci u melanómu sa mutácia *BRAF* génu vyskytuje pomerne často, u neuroblastómu bola naopak pozorovaná len v 1 % pacientov, aj keď sú oba nádory neuroektodermálneho pôvodu (Shukla a kol. 2011). Napriek nízkej incidencii sa však predpokladá vplyv mutácie V600E génu *BRAF* na malignitu tohto ochorenia. V prípade meduloblastómu je v spojitosti s génom *BRAF* málo informácií a u feochromocytómu zatiaľ žiadne. Nedá sa ale ani v týchto prípadoch vylúčiť výskyt niektorej z *BRAF* mutácií.

CTNNB1 gén (β -katenín) kóduje aktivátor a transkripčný regulátor β -katenín, ktorý zohráva dôležitú úlohu v adhézii buniek, medzibunkovej komunikácii a je súčasťou Wnt signálnej dráhy nevyhnutnej pre správny priebeh prenatálneho vývoja. β -katenín patrí medzi protoonkogény a jeho aktivačné mutácie sú asociované so vznikom viacerých typov malignít. Vysokou incidenciou takýchto mutácií sa vyznačuje kolorektálny karcinóm (Huang a kol. 2000), o niečo menej častý výskyt je v prípade hepatoblastómu, nádorov vaječníkov a prostaty. Prítomnosť *missense* mutácie bola detekovaná aj v prípade sporadického meduloblastómu. Štúdia uvádzajú incidenciu mutácie v géne *CTNNB1* 8,7 % (Huang a kol. 2000). Zaujímavé je, že mutácie *CTNNB1* sa vyskytujú spoločne s deléciou celého chromozómu 6 a spoločne sa ukazujú ako prognostické ukazovatele pre Wnt skupinu pacientov s predpokladom veľmi dobrej prognózy na prežitie (Fattet a kol. 2009). U neuroblastómu a feochromocytómu zatiaľ prítomnosť mutácie v géne pre β -katenin nebola preukázaná. Avšak rovnako, ako pri ostatných génoch, sa predpokladá možný výskyt z dôvodu neuroektodermálneho pôvodu.

Diplomová práca je zameraná na dôkaz mutácií uvedených génov v prípade vybraných neuroektodermálnych nádorov. U neuroblastómu a u meduloblastómu už prítomnosť niektorých týchto mutácií bola dokázaná a zaraďujú sa medzi prognostické faktory ich molekulárne – biologickej klasifikácie. Práca mala overiť alebo zistiť prítomnosť spomínaných mutácií a prispieť tak k zavedeniu vhodnejšej liečby prostredníctvom inhibítorov mutovaných génov.

3. Ciele práce

- Prostredníctvom molekulárno – genetických metód sledovať zmeny na úrovni DNA u vybraných 3 génov v bunkách, získaných izoláciou z tkanív neuroektodermálnych nádorov (meduloblastóm, neuroblastóm, feochromocytóm, nádory mozgu).
- U feochromocytómu zistiť prítomnosť mutácie V600E génu *BRAF*, ktorá doposiaľ nebola detegovaná.
- U meduloblastómu potvrdiť prítomnosť mutácie β -*katénínu* s prítomnosťou delécie celého chromozómu 6, a zároveň zistiť prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF*.
- U neuroblastómu potvrdiť prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF*, zistiť mutácie v exonoch 23 a 25 v géne *ALK*.
- U nádorov mozgu zistiť prítomnosť mutácie v géne *BRAF*.
- Preukázať incidenciu mutácií u vybraných nádorov, u meduloblastómu a neuroblastómu porovnať výsledky s klinickými dátami a molekulárno – genetickými prognostickými znakmi.

Hypotézy

- U feochromocytómu predpokladám prítomnosť mutácie génu *BRAF*.
- U meduloblastómu predpokladám prítomnosť mutácie β -*katénínu*, a zároveň delécie celého chromozómu 6.
- U neuroektodermálnych nádorov predpokladám prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF* a mutácie v exonoch 23 a 25 v géne *ALK*.
- U neuroblastómu predpokladám prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF*.

4. Prehľad literatúry

4.1. Nádory

Ľudský organizmus je tvorený veľkým množstvom buniek, líšiacich sa svoju veľkosťou, tvarom aj funkciou. Zdravé bunky podliehajú prísny reguláčnym mechanizmom, ktoré regulujú ich proliferáciu. Ak dôjde k poruche regulačného systému, naruší sa aj správna bunková proliferácia. Výsledkom nekontrolovaného delenia je vznik nádoru – súboru abnormálnych buniek.

Nádorové ochorenia rozdeľujeme na 2 základné skupiny, a to, benígne, tzv. nezhubné a malígne, tzv. zhubné. Benígne nádory sú oveľa častejšie ako malígne nádory. Vyznačujú sa pomalým rastom buniek. Bunky sú zrelšie a podobajú sa na bunky, z ktorých sú vyvinuté. Bunky benígneho nádoru neinfiltrujú okolité tkanivo a nešíria sa do iných častí tela (nemetastázujú). Oproti tomu malígne nádory sú charakteristické rýchlym a nekontrolovateľným rastom, schopnosťou infiltrácie, a metastázovaním.

Podľa miesta vzniku rozlišujeme dve formy nádorov, a to solídne (pevné), ktoré môžu vznikať z buniek a tkanív rôznych orgánov (Stephens a Aigner 2009). Opakom solídnych nádorov sú leukémie, ktoré netvoria pevnú hmotu. Je to zhubné nádorové ochorenie, ktoré postihuje krvotvorné tkanivo ako je kostná dreň. Spôsobí vznik abnormálnych krvných buniek, ktoré majú narušený proces dozrievania a diferenciácie a tým sa naruší správna krvotvorba.

Častým mechanizmom tvorby zhubného nádoru je vznik mutácií v regulačných génoch, medzi ktoré patria protoonkogény, tumor supresorové gény a mutátorové gény. Dôsledkom týchto mutácií sú zmeny na úrovni DNA, pričom v prípade protoonkogénov hovoríme o aktivačných mutáciách, u tumor supresorových ide o inaktivačné mutácie a u mutátorových génov o mutácie spôsobujúce narušenie funkcie. Vznik zhubného ochorenia je potom väčšinou výsledkom spolupôsobenia viacerých zmien v týchto génoch (Nussbaum a kol. 2004).

4.2. Nádory CNS u detí a mladistvých

Nádory centrálnej nervovej sústavy (CNS) predstavujú najčastejšie sa vyskytujúce solídne nádory u detí, až 20 %, a u dospievajúcich približne 9 – 10 %

(Churáčková 2008). Sú druhou najčastejšou príčinou úmrtia detí do 15 rokov po úraze. Výskyt významne závisí od veku. Najväčšia incidencia je do veku 4 rokov (3,1/100 000/rok), najnižšia vo veku medzi 15 – 24 rokov (1,8/100 000/rok). Konkrétne typy nádorov sú tiež charakteristicky späté s určitými vekovými kategóriami (Nevšímalová a kol. 2002). Približne 8 % všetkých malignít diagnostikovaných u detských pacientov mladších ako 15 rokov predstavuje neuroblastóm, ktorý je zodpovedný za neprimerané percento detských úmrtí na rakovinu, približne 15 % (Brodeur a Castleberry 1997). Až 90 % nádorov CNS u detí je intrakraniálnych (postihujúcich mozog), pričom 55 % z nich je infratentoriálnych (oblasť mozočku a mozgového kmeňu). 10% nádorov CNS je infraspinálnych, teda postihujúcich miechu (Churáčková 2008). Vznikajú buď sekundárne alebo primárne. Sekundárne ako dôsledok metastatickej aktivity nádoru z iného orgánu alebo tkaniva – to je ale u detí, na rozdiel od dospelých, vzácné a deje sa to prevažne až pri pokročilejších štádiách ochorenia. Primárne sú výsledkom nádorového bujnenia rôznych tkanív nervového systému. Veľká časť z nich je pritom benígna, neexpanduje do okolitých tkanív, ostáva v mieste vzniku a po chirurgickom odstránení už nerecidivujú (Nevšímalová a kol. 2002).

Základné nádorové rozdelenie na benígne a malígne je ale v prípade týchto tumorov relatívne. Nádory CNS tvoria heterológnu skupinu z hľadiska pôvodu. S tým súvisí fakt, že nie vždy platí, že benígny nádor nie je invazívny, pretože sa môže stať kvôli svojej lokalizácii neprístupným pre chirurgické odstránenie. Z tohto dôvodu sa nádory CNS klasifikujú na základe bunkového pôvodu a stupňa malignity podľa najnovšej verzie Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) z roku 2007 (Obrázok č.1). Táto klasifikácia je považovaná za štandard pre definíciu mozgových nádorov v klinickej onkológii (Louis a kol. 2007).

I. Nádory neuroglie (gliomy)	VI. Nádory z nervových pošiev
astrocytóm	Schwannóm (neurilemmóm)
oligodendroglióm	neurofibróm
ependymóm	maligný nádor z nervových obalov
papilóm plexus chorioideus	VII. Iné primárne vnútroparenchýmové nádory
II. Nádory neurónov	hemangioblastóm
neuroblastóm	primárny lymfóm CNS
ganglioneuroblastóm	nádory zo zárodkových buniek
ganglioneuróm	VIII. Rôznorodé nádory
III. Nádory neurónov a neuroglie	malígny melanóm
ganglioglióm	kraniofaryngióm
IV. Slabo - diferencované a embryové nádory	nádory z buniek corpus pineale
meduloblastóm	nádory z hypofýzy
neuroblastóm	IX. Nádorom podobné zmeny
PNET	epidermová cysta, dermoidná cysta, koloidná cysta)
V. Nádory meningov	X. Metastazujúce nádory
meningióm	
sarkóm meningov	

Obrázok č.1: Klasifikácia nádorov CNS podľa WHO z roku 2007.

4.2.1 Gliómy

Najčastejšie primárne nádory CNS, ktoré pochádzajú z gliových buniek, presnejšie z neuroektodermy sú gliómy. Zapríčiňujú až 40% lebečných nádorov (štatistický údaj: CBTRUS 2004:1-51, Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 1997-2001. Published by the Central Brain Tumor Registry of the United) a do tejto skupiny patrí:

- Astrocytóm
- Oligodendrocytóm
- Ependimón
- Nádory chorioidálneho plexu

e) Xantoastrocytóm

f) Gangliogliom

Gliómy sú charakteristické tým, že nie sú dobre ohraničené a prenikajú do susedných tkanív, a však len málo mimo CNS (Louis a kol. 2001).

4.2.1.1. Astrocytóm

Vzniká z astrocytárnych buniek a predstavuje najvariabilnejšiu skupinu neuroektodermálnych nádorov. Astrocytómy rozdeľujeme na difúzne a ohraničené (menej časté).

Difúzne infiltrujú mozgové tkanivo a vyskytujú sa predovšetkým u dospelých jedincov (Nevšimalová a kol. 2002). Vyskytuje sa hlavne v mozgových hemisférach, u detí postihuje hlavne mozoček, mozgový kmeň a optický nerv (infratentoriálny výskyt). Vyznačuje sa viacerými stupňami malignity a podľa WHO klasifikácie z roku 2007 sa delia do 4 štádií (*gradov*) podľa zvýšenej mitotickej aktivity, proliferácie a nekrotických zmien. I. a II. stupeň sú označované ako benígne astrocytómy, III. a IV. stupeň ako malígne. IV. stupeň je považovaný za najhorší a najagresívnejší primárny nádor vychádzajúci z mozgového tkaniva a zároveň najčastejší u dospelých.

Najčastejšou molekulárnou príčinou vzniku sa ukazuje mutácia tumor-supresorového génu *TP53*. V prípade primárnych astrocytómov boli preukázané viaceré chromozómové aberácie, ako delécie 9p, 11p, 13q, 17p, 22q. Konkrétne stupeň I je spätý s mutáciou génu *NF1* na krátkom ramienku chromozómu 17. Stupeň II sprevádzajú mutácie génov *p53*, *PDGF*, *FGF*, *EGF*, *VEGF* (Dreyfuss a kol. 2009). U III. stupňa astrocytómu pozorujeme deléciu 9p a 13q, a amplifikáciu *CDK-4*. IV. stupeň je charakteristický mutáciou tumor-supresorového génu *TP53*. LOH dlhého ramienka 10q23, na ktorom leží gén *PTEN* nachádzame u vyšších stupňoch astrocytómov. *PTEN* kóduje proteín, ktorý hrá dôležitú úlohu v angiogenéze, migrácii a invázii (Kleihues a kol. 2007).

Nedávne štúdie zistili zmeny v géne *BRAF*, ktoré sú považované za pôvodcu mutácii vedúcich k vzniku viacerých detských mozgových nádorov, vrátane astrocytómu (Dahiya a kol. 2012).

4.2.2 Embryonálne nádory

Embryonálne nádory vznikajú z nezrelých prekursorov neuronálnych a gliových buniek. Patrí sem:

- a) Meduloblastóm
- b) PNET – primitívny neuroektodermálny nádor (Louis a kol. 2007)

4.2.2.1. Meduloblastóm

Najčastejší primitívny neuroektodermálny nádor u detí – 25 % detských mozgových nádorov. Častejšie sa vyskytuje u chlapcov, pričom priemerný vek je 9 rokov (najčastejšie medzi 2-4 a 6-8 rokom) (Zitterbart a kol. 2010). Postihuje predovšetkým oblasť mozočku, odkiaľ vychádza a preniká do IV. mozgovej komory. Je schopný prenikať ako do lokálnych tkanív, tak do vzdialenejších oblastí, ako sú pľúca, kosti, pečeň. Zaraďuje sa medzi vysoko zhubné nádory (Nevšimalová a kol. 2002). Schopnosť metastázovania do iných, ako mozgových tkanív, sa spravidla vyskytuje až v posledných štádiách ochorenia. Podľa prognózy liečby sa rozlišujú dve skupiny pacientov s meduloblastómom – SR (standard risk) a HR (high risk).

Z molekulárne – genetického hľadiska boli v súvislosti s meduloblastómom dokázané určité chromozómové aberácie. Patria sem delécie 17p, izochromozóm 17q, amplifikácia *MYCN* a *MYCC*, monozómia 6 a zvýšená jadrová hladina β -katenínu (aktivácia dráhy Wnt/ β -catenín je znakom pozitívnej prognózy) (Pfister a kol. 2010). Podľa prítomnosti jednotlivých geneticko – molekulárnych markerov rozdeľujeme meduloblastómy do 4 skupín (Obrázok č. 2):

I. Wnt

- veľmi dobrá a dlhodobá prognóza (viac ako 90% šanca na dlhodobé prežitie)
- objavuje sa u starších detí
- mutácie *β -katenínu* vedú k zvýšeniu syntézy proteínov a bunkového cyklu (aktivácia Wnt signálnej dráhy)
- výskyt monozómie 6 (vynechanie jednej kópie chromozómu 6 v nádore)

II. SHH (Sonic Hedgehog signálna dráha)

- časté u detí a dospelých nad 16 rokov
- prognóza liečby je stredne dobrá
- mutácie génu *PTCH1* (kódujúci receptor PTCH)
- nádory identifikované na základe transkripčnej profilizácie

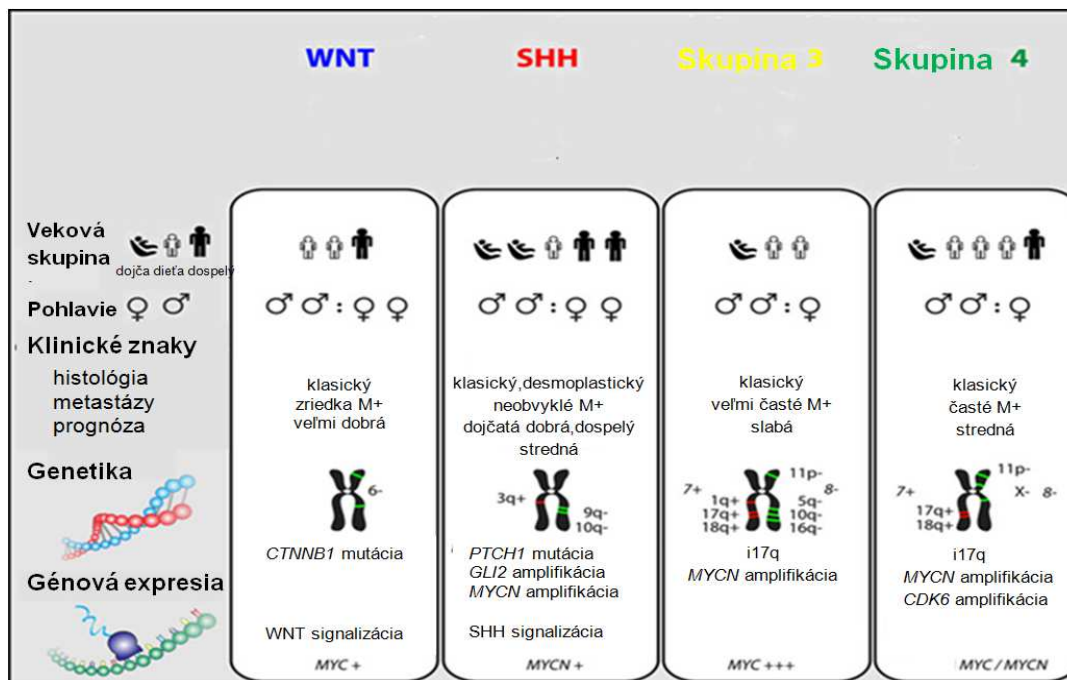
- vysoká hladina expresie *MYCN*
- delécia chromozómu 9 q zrejme obmedzená na SHH meduloblastómy (*PTCH1* gén sa nachádza na chromozóme 9q22)

III. skupina („klasický meduloblastóm“)

- väčšinou klasický histologický obraz meduloblastómu
- časté metastázy v čase stanovenia diagnózy
- zlá prognóza
- vysoká hladina expresie *MYC* (amplifikácia *MYC*)
- amplifikácia onkogénu *OTX2* (Orthodenticle Homeobox 2)
- amplifikácia 1q, 5q, 17q s/alebo bez isochromozómom 17q
- delécia 5q a 10q

IV. skupina

- predstavuje prototyp meduloblastómu: klasická histológia s isochromozómom 17q u 6-8 ročného chlapca
- molekulárna patogenéza nejasná
- isochromozóm 17q je tiež viditeľný v skupine 3 (26 %), ale je oveľa častejšie v skupine 4, kde je to najčastejšia pozorovaná cytogenetická zmena (66 %)
- 80 % žien s meduloblastómom skupiny 4 ukazuje deléciu pohlavného chromozómu X (Taylor a kol. 2011).



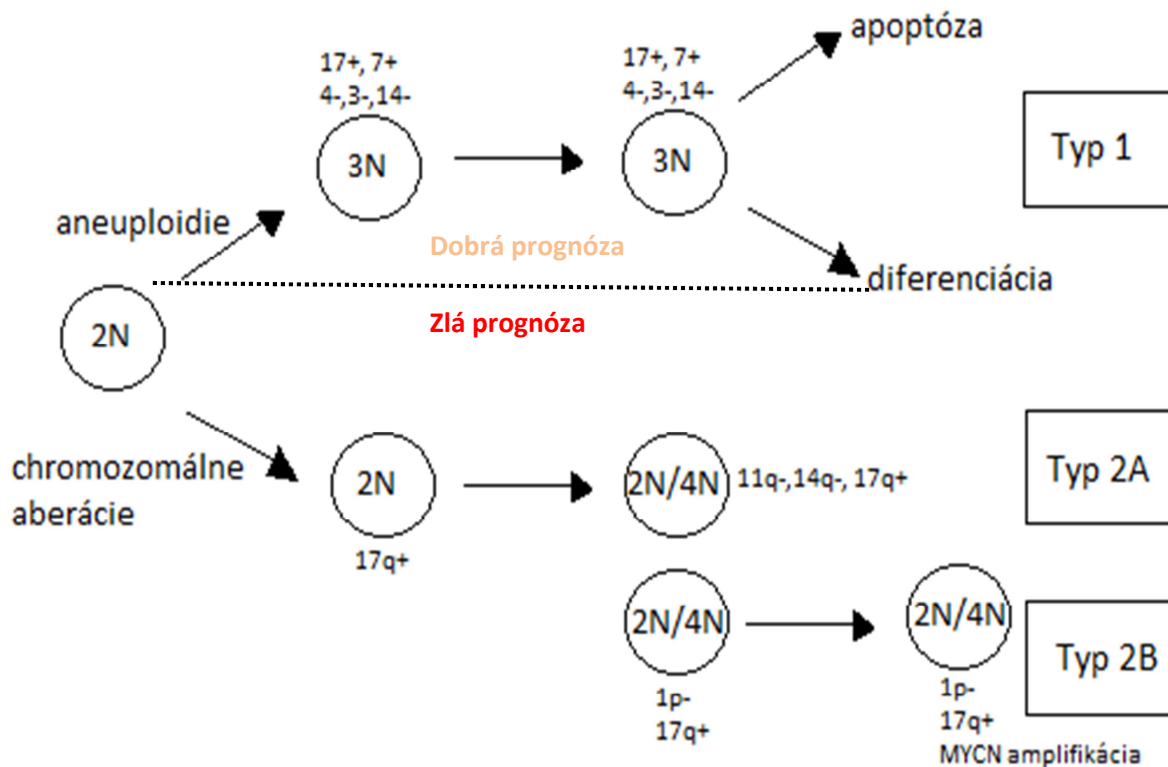
Obrázok č. 2: Rozdelenie meduloblastómov podľa geneticko-molekulárnych markerov (upravené podľa Taylor a kol. 2011).

4.2.3 Neuroblastóm

Neuroblastóm je vysoko maligný tumor periférálneho sympatického nervového systému. Po leukémiách a nádoroch mozgu je najčastejším nádorovým ochorením u detí. Asi 80 % detí je mladších ako 4 roky (Stephens a Aigner 2009). Neuroblastóm zapríčiňuje 15 % úmrtí detí v dôsledku nádorového ochorenia. Rozdiely sú porovnateľné hlavne vo vyšších štádiách ochorenia. Pravdepodobnosť celkového prežitia je až 88 % u detí (<18 mesiacov pri stanovení diagnózy). Títo pacienti majú veľmi dobrú prognózu, pričom v prípade preukázania delécie alebo zmnoženia celých chromozómov je pravdepodobnosť prežitia dokonca viac ako 95 % (Smith a kol. 2014). U detí, ktoré v dobe diagnostiky dosahujú vek 18 mesiacov - 12 rokov je to 49 %, a u dospievajúcich a mladých dospelých (≥ 12 rokov) iba 10 %. Väčšina mladých dospelých s diagnostikovaným neuroblastómom až v tomto veku má síce pravdepodobnosť prežitia nízku, ale priebeh ochorenia je pozvoľný a dlhodobý a preto je tento typ neuroblastómu tiež označovaný ako chronický (Cheung a kol. 2012).

U pacientov s neuroblastómom nachádzame rôzne výsledky v úspešnosti liečby v závislosti na rozsahu ochorenia (*staging*) a molekulárno - biologických prognostických znakov. Z molekulárno - biologického hľadiska sa rozlišujú 3 hlavné štádiá tohto nádorového ochorenia, pričom prvé dve sú charakteristické dobrou prognózou, vyššie, naopak, veľmi slabými výsledkami. Rovnako, ako pri predchádzajúcich nádoroch, aj pri neuroblastóme, sa jednotlivé štádiá vyznačujú genetickou podstatou. U nižších štádií nachádzame iba numerické chromozomálne aberácie, vyššie štádiá sú typické svojimi štrukturálnymi zmenami. Takouto zmenou je napríklad hemizygotná delécia chromozómu 1p36 alebo 11q, či naopak získanie (*gain*) 17q (Molenaar a kol. 2012). Typickou aberáciou, s výskytom u všetkých klinických štádií a vekových kategórií neuroblastómu, je amplifikácia protoonkogénu *MYCN*. Pacienti s amplifikáciou *MYCN* sú, až na výnimky, radení do biologickej skupiny vysokého rizika. Táto amplifikácia je spojená s rýchlou progresiou nádoru a zlou prognózou pre pacientov. Ukazuje sa, že s touto zmenou sú späté aj amplifikácie ďalších príbuzných génov, ako *DDX1* (DEAD Box Helicase 1) a *ALK*, pričom ich samotné amplifikácie bez *MYCN* sú zriedkavé (Ambros a kol. 2009). Klasifikácia neuroblastómu do 3 podskupín podľa prognózy na základe

preukázaných genetických zmien bola vytvorená Broderom v roku 1993 (Obrázok č. 3).



Obrázok č. 3: Klasifikácia neuroblastómu podľa Broudera (upravené podľa: Vícha a Eckschlager, 2008).

Preukázaná bola tiež prítomnosť mutácie génov *BRAF*, *RAS* a *MAP2K1*, ale len v prípade, že sa nevyskytovala mutácia *ALK*. V niekoľkých málo prípadoch sa objavili aj mutácie *CTNNB1* (β -catenin) (Shukla a kol. 2011). Vyskytuje sa podskupina pacientov 2N/4N vykazujúcich deléciu 11q a zisk 17q a deléciu 3p, na ktorom leží práve *CTNNB1*, ale bez amplifikácie *MYCN* (<http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/neurob5002.html>). U niektorých pacientov s vysokým štádiom neuroblastómu boli objavené lokálne rozkúskované chromozómy (tzv. *chromothripsis*). Nedávne štúdiá ukázali mutácie v géne *ATRX* u pacientov s vysokým štádiom neuroblastómu (Cheung a kol. 2012).

4.2.4 Feochromocytóm

Feochromocytóm patrí medzi neuroendokrinné nádory produkujúce katecholaminy. Feochromocytómy sa rozdeľujú na dve skupiny podľa časti neurálnej lišty z ktorej vznikli, pričom sa navzájom líšia genetickým základom, klinickými prejavmi aj prognózou. Prvou skupinou je klasický feochromocytóm (FEO), ktorý

vzniká a vyskytuje sa v nadobličkovej dreni. Druhú skupinu tvoria paragangliómy (PARA), vznikajúce zo sympatických a parasympatických ganglií a ich výskyt môže byť rôzny (oblasť brucha, hrudníka, krku, panvy) (Zelinka 2007) .

Väčšina FEO a PARA je benigných, no môže dôjsť k prítomnosti metastáz, a to v prípade pacientov so špecifickým genetickým obrazom (Brouwers a kol. 2006). Výskyt tohto typu tumoru je vzácny a väčšinou je spájaný s autozomálne dominantnými genetickými syndrómami Von Hippel-Lindau syndróm, neurofibromatóza typu 1, syndróm endokrinnnej neoplázie typu 2 (MEN2), familiárna paragangliomatóza a iné. Pacienti s týmito syndrómami majú mutácie v génoch, ktoré podporujú vznik neuroendokrinných nádorov (Opocher a Schiavi 2011). Najnovšie štúdie ukazujú, že 30-40 % FEO a PARA (Karásek a kol. 2012) majú dedičný charakter, pričom prvé tvrdenia uvádzali dedičný pôvod len u 10 % prípadov tohto typu tumoru (Neumann a kol. 2002). V prípade sporadického výskytu feochromocytómov (10-24 %) boli zistené somatické mutácie (Burnichon a kol. 2011, Welander a kol. 2012).

Doposiaľ bolo zistených 18 génov, ktoré sa podieľajú na vzniku feochromocytómov a paragangliómov. Jeden z najdôležitejších sa ukazuje tumor supresorový gén *VHL* a jeho zárodočné mutácie, ktoré sú príčinou vzniku syndrómu Von Hippel-Lindau. Ďalším génom, ktorého mutácie sú príčinou vzniku neurofibromatózy 1 a je často spájaný s výskytom feochromocytomu, je tumor supresor *NF1* (Vícha a kol. 2013). Aktivačná mutácia protoonkogénu *RET* sa vyskytuje u 50 % feochromocytómov a spôsobuje vznik syndrómu MEN2 (Opocher a Schiavi 2011). V prípade paragangliómu často nachádzame prítomnosť mutácie génov *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* a *SDHAF2*, čo sú gény kódujúce komplexné podjednotky sukcinát dehydrogenázy. Najnovšie štúdiá zahŕňajú súvislosť medzi FEO/PARA a génmi *THM127*, *MAX*, *HIF2A*, *KIF1Bβ*, *PHD2* / *EGLN1*, *H-RAS*, *K-RAS*, *IDH*, *FH*, a *BAP* (Jochmanova a kol. 2014).

4.3. Študované gény

4.3.1 β-katenín (CTNNB1)

Študovaný gén *CTNNB1*, leží na chromozóme 3p21 a má 17 exónov (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1499>). Konkrétne je lokalizovaný v rozpätí od

bázového páru 41,199,450 po bázoový pár 41,240,447 na chromozóme 3 (Obrázok č. 4).

Obrázok č. 4: Lokalizácia génu *CTNNB1* na chromozóme 3 (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1>).

Proteín, kódovaný génom *CTNNB1* (β -katenín) je z molekulárneho hľadiska je považovaný za aktivátora expresie niektorých génov, z biologického za dôležitý transkripčný regulátor. β -katenín je dôležitou súčasťou mnohých typov buniek a tkanív, v ktorých zohráva úlohu hlavne pri adhézii buniek a medzibunkovej komunikácii (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1>). Túto adhéznu funkciu vykonáva spolu s ďalšími proteínmi, s ktorými je súčasťou komplexu na vytváranie adhéznych spojov. Kódovaný proteín tiež zabezpečuje ukotvenie aktínu cytoskeletu, čím môže dôjsť k prenosu inhibičného signálu medzi bunkami a tým zastaveniu bunkového delenia, keď je epiteliálny list kompletný (Peifer a kol. 1993).

bin/carddisp.pl?gene=CTNNB1&search=5a662dbe6689936ef25b9093cd9269fe podľa TOCRIS, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1>).

β -katenín má mnoho ďalších funkcií. Príkladom je jeho aktivita v bunkách vlasového folikulu, kde zabezpečuje jeho normálnu funkciu a tým správny rast a vývoj vlasov. Najnovšie štúdie dokonca ukazujú, že aktívny (nefosforylovaný) β -katenín je schopný vyvolať rast vlasov (Deschene a kol. 2014). Tento fakt dokazuje jeho schopnosť stimulovať proliferáciu.

β -katenín je v bunke lokalizovaný v cytoplazme, alebo v bunkovom jadre podľa stability proteínu. V prípade vysokej úrovne fosforylácie, alebo väzby na CDH1 je nestabilný a nachádza sa v cytoplazme. Keď sa zníži úroveň fosforylácie, dostáva sa do stabilného stavu a je translokovaný z cytoplazmy do jadra. Väčšina β -katenínu je lokalizovaná na bunkovej membráne ([http://www.uniprot.org/uniprot/P35222](http://www.uniprot.org/uniprot/P35222#section_seq) – subcellular location).

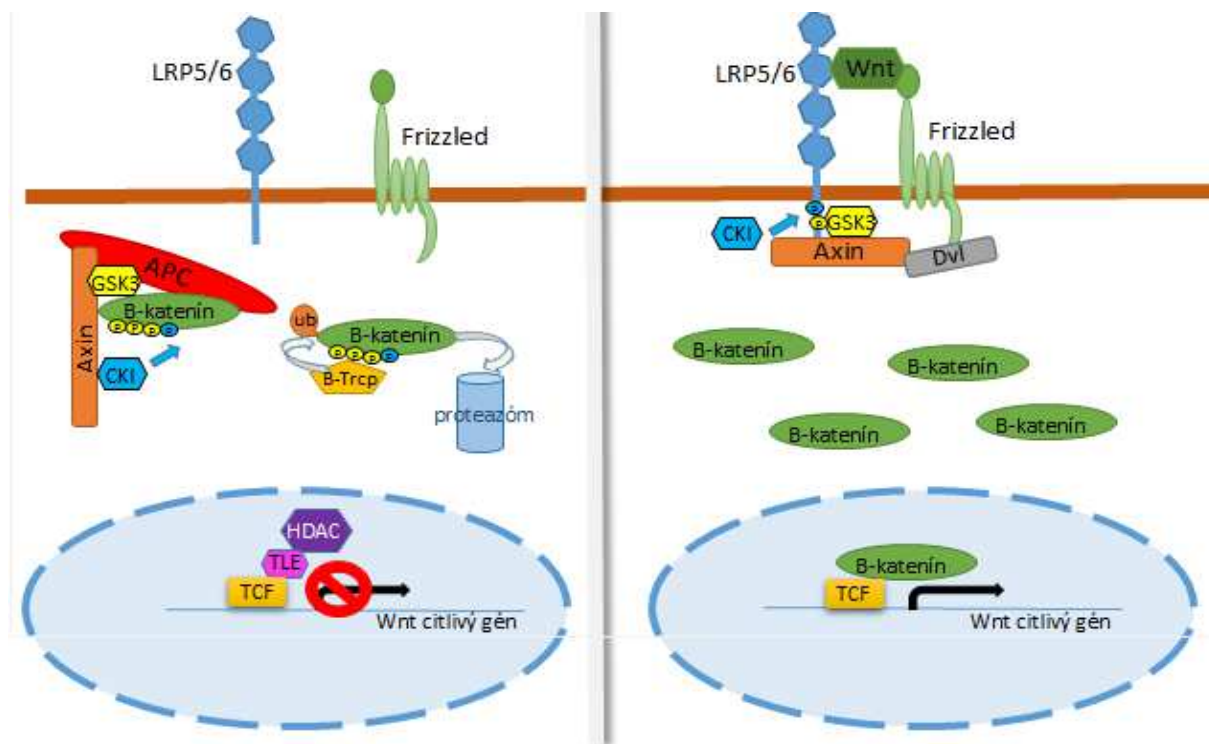
4.3.1.1. Wnt/ β -katenín signálna dráha

Wnt/ β -katenín kanonická signálna dráha riadi expresiu génov v jadre, ktoré sú kľúčové pre vývoj, proliferáciu a polaritu bunky a tkanivovú homeostázu (Logan a Nuss 2004). Spustenie signálnej dráhy je závislé od prítomnosti glykoproteínov Wnt rodiny na vonkajšej strane membrány.

V neprítomnosti Wnt ligandu je signálna dráha vypnutá, čo znamená, že β -katenín je v cytoplazme blokovaný. Blokovanie β -katenínu zabezpečuje komplex, ktorého je súčasťou a tvorí ho Axin proteín, APC (adenomatosis polyposis coli), CK1 (kazeín kináza 1) a GSK3 (glykogén syntáza kináza 3). CK1 a GSK3 postupne fosforylujú koncovú časť β -katenínu, ktorý je vďaka fosforylácii rozpoznávaný E3 ubiquitin ligázou β -Trcp. Tá ubiquitináciou β -katenínu určuje jeho prechod do proteazómu, v ktorom je β -katenín degradovaný (He a kol. 2004). Keďže dochádza k degradácii už v cytoplazme, expresia cieľových génov v jadre ostáva potláčaná komplexom TCF/LEF (DNA viažúci faktor T-buniek/lymfoidný enhancerový faktor) - TLE/HDAC (histondeacetyláza).

Wnt/ β -katenín signálna dráha je spustená v prítomnosti Wnt ligandu. Ten sa viaže na transmembránový receptor Frizzled (Fz) a jeho lipoproteínový ko-receptor LRP 5 alebo LRP 6. Vytvára sa tak komplex Wnt-LRP5/6-FZ a na Fz sa v cytoplazmatickej časti viaže ešte proteín Dishwelled (DSH). Vytvorením tohto

komplexu sa zabezpečí fosforylácia LRP5/6 pomocou CK1 a GSK3, čím sa uvoľní Axin z komplexu s β -katenínom a presúva sa na membránový receptorový komplex LRP-Fz. Rozrušením Axin komplexu nedochádza k degradácii (fosforylácii a ubiquitinácii) β -katenínu a ten sa v cytoplazme stabilizuje. Takto stabilizovaný β -katenín prechádza do jadra k cieľovým génom, kde sa viaže na TCF, slúži ako jeho ko-aktivátor a spúšťa expresiu Wnt cieľových génov (Obrázok č. 5) (MacDonald a kol. 2009).



Obrázok č. 5: GSK3 (glykogén syntáza kináza 3) a CK1 (kazeín kináza 1), ktoré sú súčasťou komplexu s Axin a APC (adenomatous polyposis coli), fosforylujú β -katenín. Takto fosforylovaný β -katenín je rozpoznávaný β -Trcp, ubiquitinovaný pomocou E3 (ubiquitin ligáza) a degradovaný v proteazóme. β -katenín neprechádza do jadra a transkripcia cieľových génov je potláčaná väzbou DNA väzobných faktorov TCF (T-bunkový faktor) v komplexe s TLE-HDAC (histondeacetyláza). Väzba Wnt ligandu na Fz (Frizzled) a LRP5/6 (lipoproteínového receptora príbuzný proteín) aktivuje väzbu Dsh (Dishwelled) na cytoplazmatickú časť Fz, fosforyláciu LRP a naviazanie Axin komplexu. Axin komplex nezabezpečí fosforyláciu β -katenínu, ktorý nie je ubiquitinovaný a degradovaný. Stabilizuje sa a akumuluje v cytoplazme, prechádza do jadra a v komplexe s TCF aktivuje transkripciu Wnt cieľových génov. (Upravené podľa: MacDonald a kol. 2009).

Signálna dráha Wnt/ β -katenín je extrémne dôležitá pre embryonálny vývoj, osud a proliferáciu bunky, a preto mutácie v nej sú príčinou viacerých vrodených väd (napr. FAP – familiárna adenomatózna polypózia, hereditárna mutácia Axin2 s predispozíciou na kolorektálne nádory), chorôb a vzniku tumorov (Clevers a kol. 2006). So vznikom nádorových ochorení sú spojené inhibičné mutácie predovšetkým tumor-supresorových génov zabezpečujúcich kontrolu nad hladinou

β -katenínu v cytoplazme. Sú to *APC*, *Axin*, *WTX*, ale aj aktivačné mutácie v samotnom onkogénne *β -katenín*.

4.3.1.2. *β -katenín a nádorové ochorenia*

Somatická mutácia v géne *CTNNB1* kódujúci β -katenín je, ako už bolo vyššie uvedené, príčinou viacerých nádorových ochorení, ako kolorektálny karcinóm (až viac ako 50%) (Sparks a kol. 1998), pilomatrixóm, hepatoblastóm, meduloblastóm, rakovina vaječníkov a prostaty (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1499>). Ukazuje sa, že *gain-of-function* mutácia v tyrozín – kinázových doménach tohto génu zabraňuje degradácii β -katenínu v prípade, že už nie je potrebný. Ten sa v bunke začne hromadiť a presúvať do jadra, kde pôsobí ako transkripčný faktor a zabezpečuje nekontrolovaný rast a delenie. Kvôli tejto schopnosti, umožniť normálnej bunke stať sa nádorovou, sa zaraďuje gén *CTNNB1* medzi onkogény (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1>). Nasvedčujú tomu aj jedny z prvých objavených mutácií tohto génu v súvislosti s tumormi, kedy sa zistilo, že mutovaná je len jedna alela génu *CTNNB1* a tá je schopná zabezpečiť odolnosť β -katenínu voči degradácii pôsobením APC. Somatická mutácia má teda dominantný charakter, čo je ďalším znakom onkogénov (Morin a kol. 1997). Výskyt germinálnej mutácie *CTNNB1* bol preukázaný aj u pacientov s ťažkou mentálnou retardáciou, u ktorých de novo mutácia viedla k strate funkcie tohto génu (de Ligt a kol. 2012).

Nádorové ochorenia zapríčinené mutáciou *CTNNB1* génu, a tak zvýšenou expresiou β -katenínu, sú úzko spojené s mutáciami APC génu, ktorý reguluje úroveň β -katenínu (Behrens a kol. 1996). Mutácie APC génu spôsobujú vznik skráteného proteínu, ktorý stratí regulačnú funkciu a dochádza k hromadeniu β -katenínu (Munemitsu a kol. 1995). Súvislosť medzi týmito dvoma génmi a ich mutáciami je najčastejšie spájaná s kolorektálnym karcinómom (Huang a kol. 2000). Ten môže byť dôsledkom mutácií v *β -kateníne*, ktoré postihujú jedno zo 4 fosforylačných miest v blízkosti N –konca β -katenínového proteínu (Koesters a kol. 2001). Taktiež u sporadického hepatoblastómu, najčastejšom malígnom detskom nádore pečene, bola preukázaná vysoká frekvencia mutácií v géne pre β -katenín (Curia a kol. 2007). Obzvlášť dôležité sú mutácie v niektorých kodónoch exónu 3, postihujúce serín/threoninové zvyšky. Tie sú fosforylované komplexom APC, ktorý tým ovplyvňuje degradáciu β -katenínu. Práve v týchto fosforylačných miestach dochádza

k väčšine mutácií zapríčiňujúcich nielen hepatoblastóm, ale aj viacero iných typov nádorov (Morin a kol. 1997). U jednotlivých nádorov sa ale líšia postihnuté kodóny. Konkrétne u hepatoblastómu sú hotspotmi kodóny 32, 34, 37 a 41, v ktorých dochádza k *missense* mutáciám (Udatsu a kol. 2001). U kolorektálneho karcinómu je to substitučná mutácia v kodóne 45, spôsobujúca zámenu serínu za fenylalanín (Koch a kol. 1999).

Spojitosť medzi β -katenínom a ďalším detským nádorom - Wilmsovým nádorom/nefroblastómom, ukázali taktiež viaceré štúdie. Jedná sa o súvislosť aktivačných mutácií v β -kateníne a stratou funkcie WTX proteínu. WTX proteín (kódovaný Wilmsovým tumor génom ležiacim na chromozóme X) je súčasťou komplexu proteínov, podieľajúcich sa na ubiquitinácii a degradácii β -katenínu. V prípade spomínaných mutácií u nefroblastómu dochádza k hromadeniu β -katenínu a tak nekontrolovanej proliferácii buniek (Major a kol. 2007).

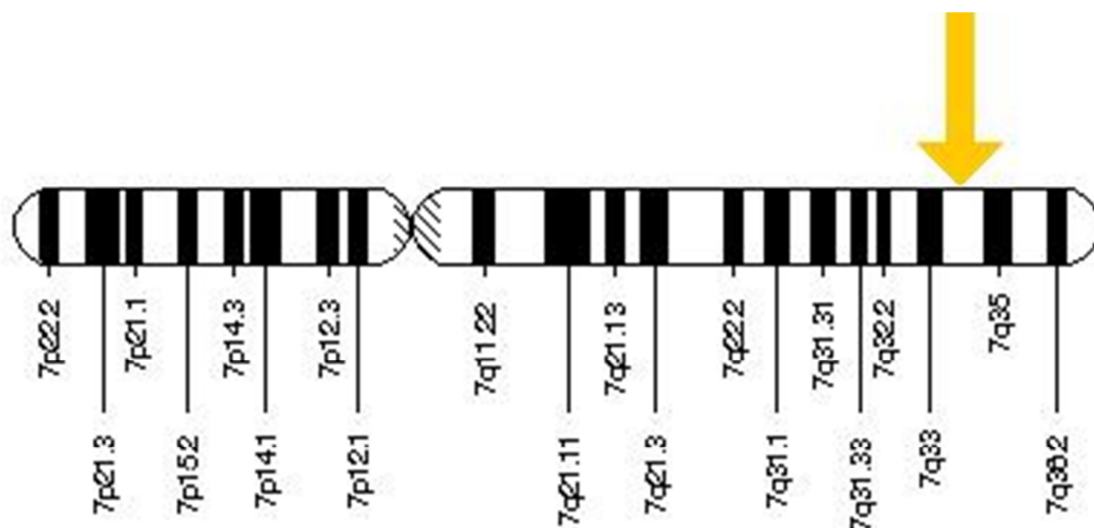
Už dávnejšie štúdie sa zamerali aj na, menej často sa vyskytujúci, sporadický meduloblastóm (Zurawel a kol. 1998, Huang a kol. 2000). Ukázalo sa, že mutácie β -katenínu boli v 8,7 % študovaných sporadických meduloblastómov, pričom sa vyskytovali najmä u detí mladších ako 16 rokov. Väčšina mutácií sa nachádza v kodónoch 33 (substitúcia zo serínu na fenylalanín) a 37 (substitúcia zo serínu na alanín). Kodóny 33 a 37 teda u meduloblastómu predstavujú hotspoty pre mutácie v géne *CTNNB1*. (Huang a kol. 2000). Zaujímavé je, že takmer všetci pacienti s meduloblastómom, u ktorých bola preukázaná mutácia v β -kateníne, mali zároveň deléciu celého chromozómu 6. Zároveň sa potvrdzuje, že asociácia monozómie 6 a mutácie v β -kateníne je prítomná u pacientov I. štádia (Wnt skupina), ktoré je spájané s veľmi dobrou prognózou na prežitie. Naopak u pacientov vyšších gradov nebola mutácia členov Wnt dráhy, teda aj β -katenínu, a strata chromozómu 6 prítomná. Tieto zistenia potvrdzujú, že prítomnosť mutácie génu β -katenín (s monozómiou 6) by mala byť všeobecne prijatá ako determinátor skupiny pacientov štádia I. Taktiež poukazujú na liečbu de-eskaláciou (počiatočná liečba v nižších dávkach), ktorá by mala byť braná do úvahy (Fattet a kol. 2009).

Tým, že je signálna dráha Wnt/ β -katenín relatívne dobre preskúmaná, umožňuje to vyvíjať terapeutickú liečbu zameranú na konkrétne komponenty dráhy. Či už blokovaním väzieb β -katenínu-TCF (Lepourcelet a kol. 2004), alebo stabilizovaním Axin proteínu, ktorý by zabezpečoval degradáciu β -katenínu v nádorových bunkách v prípade, že je potlačená funkcia APC (Chen a kol. 2009).

Ako jednou z možností sa ukazujú tiež látky blokujúce interakciu Fz a Wnt, teda zabráňujúce spustenie samotnej Wnt/ β -katenín signálnej dráhy (Zhang a kol. 2009). Cieľom všetkých týchto terapeutických zameraní je zasiahnutie rakovinových buniek bez poškodenia normálnej bunkovej homeostázy (MacDonald a kol. 2009).

4.3.2 BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)

Génom, súvisiacim so študovanými nádormi, je tiež gén *BRAF*. *BRAF* leží na chromozóme 7q34 a tvorí ho 20 exónov (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>) . Na krátkom ramienku siedmeho chromozómu sa nachádza v rozpätí od bázoého páru 140,719,333 do 140,924,763 (Obrázok č. 6). Zistilo sa, že neaktívny pseudogén *BRAF2* sa nachádza na krátkom ramienku X chromozómu v polohe 13 (Eychene et al. 1992).



Obrázok č. 6: Lokalizácia génu *BRAF* na chromozóme 7 (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRAF>).

Gén *BRAF* kóduje serín/threonínovú proteín kinázu B-raf, ktorá patrí do rodiny RAF proteínov. Proteín B-raf je súčasťou signálnej dráhy RAS/MAPK, v ktorej hrá dôležitú regulačnú úlohu. Ako súčasť tejto signálnej dráhy ovplyvňuje delenie, proliferáciu, diferenciáciu, migráciu a apoptózu buniek (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>, RefSeq, júl 2008). Má úlohu pri prenose vonkajších chemických signálov do vnútra bunky a jeho správna funkcia je nevyhnutná pri prenatálnom vývine (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRAF>).

Reťazec proteínu, kódovaného génom *BRAF*, má dĺžku 766 aminokyselín a začína iniciátorom - Methionínom v pozícii 1. Od pozície 2 po pozíciu 766 pokračuje samotná sekvencia proteínu. Sekundárnu štruktúru B-raf proteínu tvoria alfa helixy,

beta vlákna a otáčky (<http://www.uniprot.org/uniprot/P15056>). Konzervovanou oblasťou je serín/threonínová bohatá oblasť a C-terminálna kinázová doména. V C-terminálnej doméne sa nachádza ATP-väzobné miesto a katalytický lyzín (katalytická funkcia proteínu je závislá od ATP) (Sithanandam a kol. 1990). Typickou štruktúrou sú domény - tzv. „zinc-finger“. Zinc-finger domény sú malé, funkčné, na sebe nezávislé domény, ktoré koordináciou jedného alebo viacerých zinkových iónov stabilizujú svoju štruktúru a líšia sa funkciou, štruktúrou, interakciami a lokalizáciou. V prípade B-raf je aktivita proteínu závislá práve na väzbe Zn^{2+} ako kofaktora v tejto Zinc doméne, ktorá sa konkrétne nachádza v pozícii 234 – 280. Pred Zinc doménou sa ešte v pozícii 155 – 227 nachádza RBD (Ras binding domain), teda Ras väzobná doména a za Zinc doménou, v pozícii 457–717, proteín kinázová doména (<http://www.uniprot.org/uniprot/P15056>).

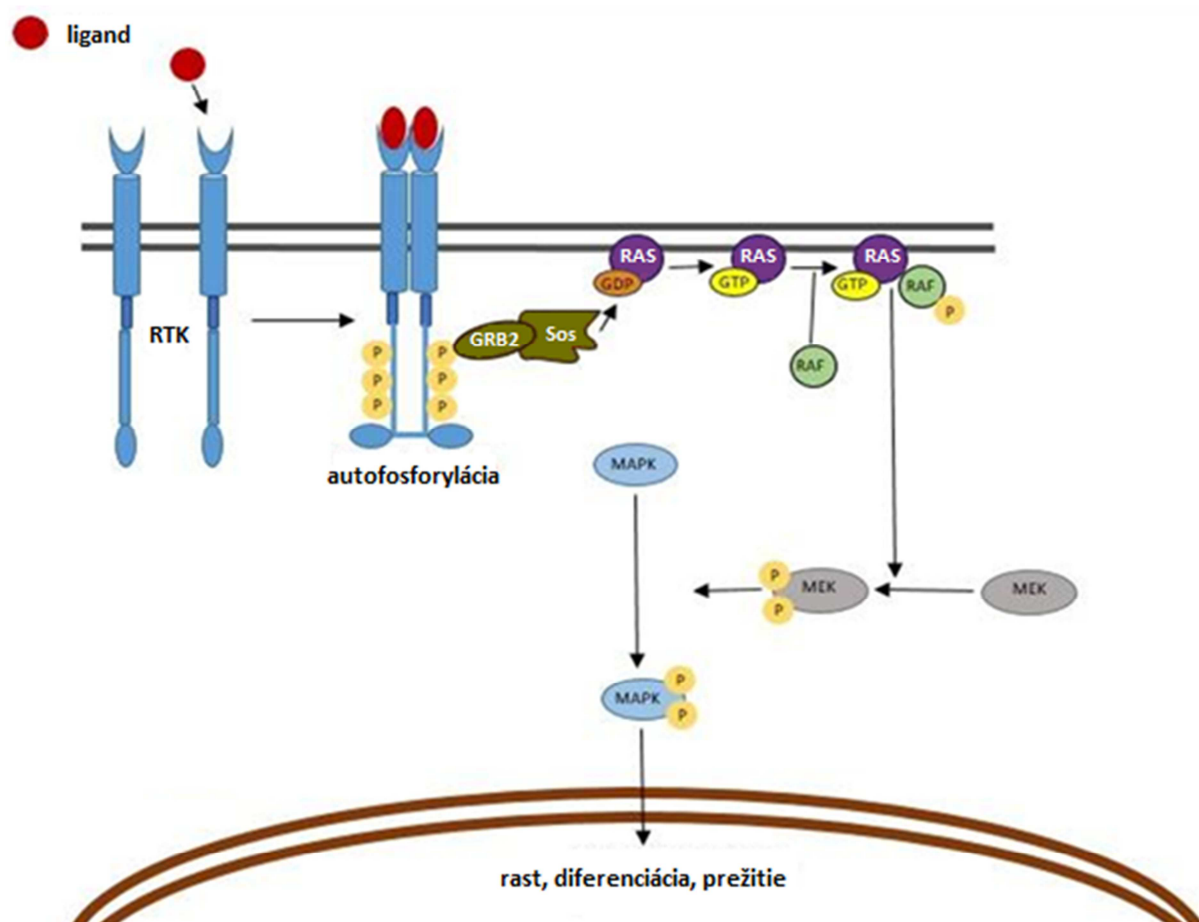
V bunke je B-raf lokalizovaný v cytoplazme aj v bunkovej membráne. Čo sa týka tkanivovej špecificity, je exprimovaný v mozgu a semenníkoch (<http://www.uniprot.org/uniprot/P15056>).

4.3.2.1. MAPK/ERK signálna dráha

B-raf je jedným z funkčných Raf proteín kináz (spolu s A-raf a Raf-1), ktoré sú súčasťou kľúčovej signálnej dráhy, a to MAPK/ERK kaskády (Wan a kol. 2004). MAPKs sú mitogénom aktivujúce proteín kinázy, ktoré stoja za signalizáciou zabezpečujúcou reguláciu exprese génov zodpovedných za proliferáciu, migráciu, diferenciáciu, angiogénu a reguláciu apoptózy buniek (Blumer a Johnson 1994). MAPK/ERK signálna dráha zahŕňa malý G-proteín Ras, ktorý sa viaže na vnútornom povrchu bunkovej membrány (Braun a kol. 2008). Ďalšími proteínmi tejto signálnej dráhy sú spomínané kinázy Raf, ďalej kináza MEK 1/2 a ERK 1/2.

Aktivácia signalizácie je zabezpečovaná ligandom, ktorý sa viaže na RTKs (receptor tyrozín kinázy) na bunkovom povrchu. Naviazanie ligandu zabezpečí autofosforyláciu vlastnej SH2 domény, ktorá priberie rastový faktor Grb2 (adaptorový proteín s SH2 doménou pre aktivovaný receptor) (Knights a kol. 2014). Grb2, prostredníctvom ďalších dvoch domén SH3, lokalizuje GEFs (guanin nukleotid zamieňajúci faktor) na bunkovej membráne a iniciuje zmenu GDP (guanozín difosfát) na GTP (guanozín trifosfát) u Ras proteínu, čím sa Ras stane aktívnym (Vetter a kol. 2001). Aktívny Ras fosforyluje serín/threonínové zvyšky Raf, ktorý

vytvára homo/ heterodíméry a aktivuje sa. Následne Raf fosforyluje serín/threonínové zvyšky MEK 1/2, ktorý je substrátovo špecifický na ERK 1/2 (Obrázok č. 7).



Obrázok č. 7: Po naviazaní ligandu na RTK (receptor tyrozín kináza) dochádza k dimerizácii RTK a autofosforylácii intracelulárných domén diméru. Na fosforylovaný RTK sa viažu adaptorový proteín Grb2 a ten viaže GEF proteín Sos. Sos viaže Ras a vymieňa mu GDP za GTP, čím sa aktivuje Ras kinázová aktivita. Aktivovaný Ras fosforyluje Raf kinázu, ktorá následne fosforyluje a aktivuje MEK kinázu. MEK kináza fosforyluje MAPK kinázu, tá aktivuje expresiu transkripčných faktorov v jadre, ktoré zabezpečujú proliferáciu, diferenciáciu a potláčajú apoptózu (Upravené podľa: Kleinschmidt 2006).

ERK 1/2 vzápätí reguluje cieľové transkripčné faktory zabezpečujúce rast a prežitie. Táto signálna dráha má svoj podiel na regulácii apoptózy tým, že zvyšuje expresiu proteínov „pre prežitie“ (Bcl-2) a antiapoptických proteínov, ktoré sú zodpovedné za degeneráciu proteazómov (Balmanno a kol. 2009).

Mutácie v receptoch a aktivačné mutácie v génoch kódujúcich zúčastnené proteíny (napríklad v géne *BRAF*), spôsobujú konštitutívnu signalizáciu ERK. Dôsledkom je teda nekontrolovaná proliferácia, rezistencia na apoptózu a liečbu (Chappel a kol. 2011). Aktivovaná ERK signálna dráha tiež podporuje expresiu metaloproteinázy, ktorá zabezpečuje degradáciu proteínov extracelulárnej matrix

a teda následnú migráciu nádorových buniek a inváziu tumoru do okolitých tkanív (Chakraborti a kol. 2003). Práve mutácie signálnej dráhy MAPK/ERK sú spájané s viacerými ochoreniami a teda inhibícia jej zložiek sa ukazuje ako sľubný terapeutický cieľ. V súčasnosti je, napríklad u nádorových ochorení, už v predklinických a klinických štádiách viacero inhibítorov proti jednotlivým súčastiam MAPK/ERK signálnej dráhy. Konkrétne inhibítory kinázovej funkcie Raf a MEK predstavujú najviac študovaných a pokročilých prístupov, ktoré majú za cieľ blokovanie jej priebehu. Naopak inhibítory ERK1 a ERK2 doposiaľ neboli popísané (Roberts a Der 2007).

4.3.2.2. BRAF a ochorenia

Gén *BRAF* patrí medzi onkogény, čiže v prípade mutácie je schopný spôsobiť nádorové bujnenie (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>). Mutácie génu *BRAF* boli nájdené v mnohých rozličných typoch nádorových aj nenádorových ochorení, pričom sa jedná prevažne o *missence* mutácie. Najčastejšie sa vyskytujúcou mutáciou, teda hotspotom, je transverzia 1799T>A v kodóne 15. Je to substitučná mutácia, označovaná ako V600E, ktorá zamieňa valín za kyselinu glutámovú. Radí sa medzi aktivačné mutácie, pretože sa ňou zabezpečí permanentne aktívny stav proteínu B-raf a teda zvýšená kinázová aktivita, nezávisle na signalizácii RAS proteínom (Davies a kol. 2002).

Nenádorové ochorenia, ktorých častou príčinou sú práve mutácie génu *BRAF*, sú CFC syndróm (Cardiofaciocutaneous syndrome, obrovský vrodený melanocytárny névus, Leopardí syndróm a Noonan syndróm (Sarkozy a kol. 2009). Navzájom sa líšia svojimi charakteristickými vlastnosťami, ale spoločne sa vyznačujú kožnými poruchami, často spojenými so srdcovo-cievnyimi ochoreniami a odlišnosťami tvárových čŕt. Spoločným molekulárnym základom týchto ochorení sú mutácie v signálnej dráhe RAS/MAPK, ktorej je B-raf súčasťou. V prípade génu *BRAF*, v súvislosti s týmito ochoreniami, boli, okrem hotspotu V600E, objavené viaceré iné typy substitučných heterozygotných mutácií (Rodriguez-Viciano a kol. 2006).

Medzi nádorové ochorenia, ktorých je z veľkej väčšiny príčinou mutácia *BRAF* génu, patrí kožný melanóm. Až u 66 percentách vyšetrovaných prípadov sa vyskytuje mutácia v sekvencii DNA, ktorá kóduje kinázovú doménu B-raf - V600E (Davies a kol. 2002). Menej často sa mutácia *BRAF* génu vyskytuje u kolorektálneho

karcinómu. Ukázalo sa, že táto mutácia je, v prípade kolorektálneho karcinómu, prítomná len za neprítomnosti mutácie *KRAS* génu (Rajagopalan a kol. 2002). Pre pacientov navyše znamená zlý prognostický faktor (Tol a kol. 2009). V menšom percente sa mutácie *BRAF* vyskytujú u pacientov s ľudským karcinómom pľúc. Konkrétne sa jedná o substitučné mutácie v exóne 11 (G465V) a v exóne 15 (L596R) (Naoki a kol. 2002). U nádoroch štítnej žľazy sa mutácia V600E v *BRAF* géne ukazuje ako marker pokročilého štádia ochorenia (Namba a kol. 2003).

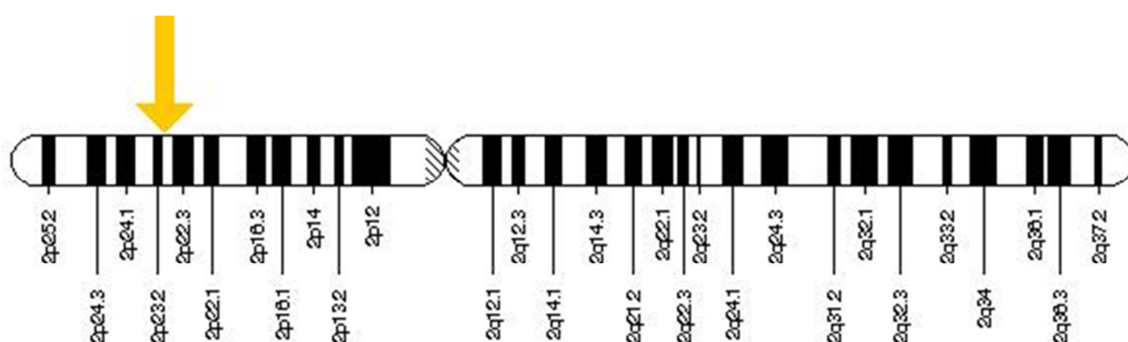
Jedným zo študovaných nádorových ochorení, na ktorý je táto práca zameraná, je astrocytóm. V súvislosti s génom *BRAF* už bolo vykonaných niekoľko štúdií, ktoré potvrdili vplyv jeho mutácií na vývoj sporadického pilocytického astrocytómu (nízke štádium WHO I). Jedná sa o tandemovú duplikáciu v géne 7q34 (Dahiya a kol. 2012). Vedie k vzniku onkogénneho *BRAF*, konkrétne o somatickú 3pb inzerciu v nukleotide 1795/1796 v kodóne 598. Inzercia 3 nukleotidov za 1 nukleotid v pozícii 1795/1796 vedie k zaradeniu threonínu v blízkosti hotspotu V600E, čím sa zabezpečí nepretržite aktívny B-raf (Jones a kol. 2009, Yu a kol. 2009). Konkrétne k tomu dochádza fúziou medzi génmi *KIAA1549* a *BRAF*, kedy *KIAA1549* fúzuje do regiónu *BRAF* génu obsahujúceho kinázovú doménu. Najčastejšie sú to fúzie *KIAA1549* exónu 16 a *BRAF* exónu 9, *KIAA1549* exónu 15 a *BRAF* exónu 9, a *KIAA1549* exónu 16 a *BRAF* exónu 11 (Dahiya a kol. 2012). Prítomnosť fúzneho *KIAA1549/BRAF* sa líši u detí a dospelých. V prípade detského astrocytómu sa vyskytuje v nízkych *gradoch* I a II, u dospelých sa neobjavuje vôbec. Rozdiel vo výskyte je tiež v prípade *BRAF* mutácie V600E. U detí je prítomná vo vyšších *gradoch*, u dospelých naopak u nízkych. Najnovšie štúdiá potvrdili výskyt *BRAF* mutácie V600E aj u 1 % neuroblastómov, ale len v prípade, keď sa nevyskytovala mutácia *ALK* (Shukla a kol. 2011).

Identifikácia hotspotovej mutácie v géne *BRAF* a dôkaz jej výskytu u jednotlivých ochorení, má dôležitý význam pre potenciálne liečebné postupy. Na trhu je už viacero liečiv pôsobiacich ako inhibítory signálnej dráhy MAPK, ktoré sa ukazujú ako veľmi účinné. Jednotlivé inhibítory sa odlišujú svojim cieľom pôsobenia v rámci MAPK/ERK signálnej dráhy, a ich účinnosť sa líši aj od typu ochorenia. Inhibítory *RAF* sú napríklad účinné v tumoroch s *BRAF* mutáciou, ale nie v prípade prítomnosti aj *RAS* aj *BRAF* mutácie (Poulikakos a kol. 2010). Inhibítory *MEK* zabezpečujú v prítomnosti *BRAF* mutácie úplné zastavenie rastu nádoru, ale u *RAS* mutácie len čiastočné (Solit a kol. 2006). Niektoré typy inhibítorov, napríklad *BRAF*

inhibítor Vemurafenib, je síce účinný u melanómu, ale len málo u kolorektálneho karcinómu, u ktorého sa naopak ukazuje účinná kombinácia inhibítora *BRAF* a *EGFR* (Prahallad a kol. 2012).

4.3.3 ALK (Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase)

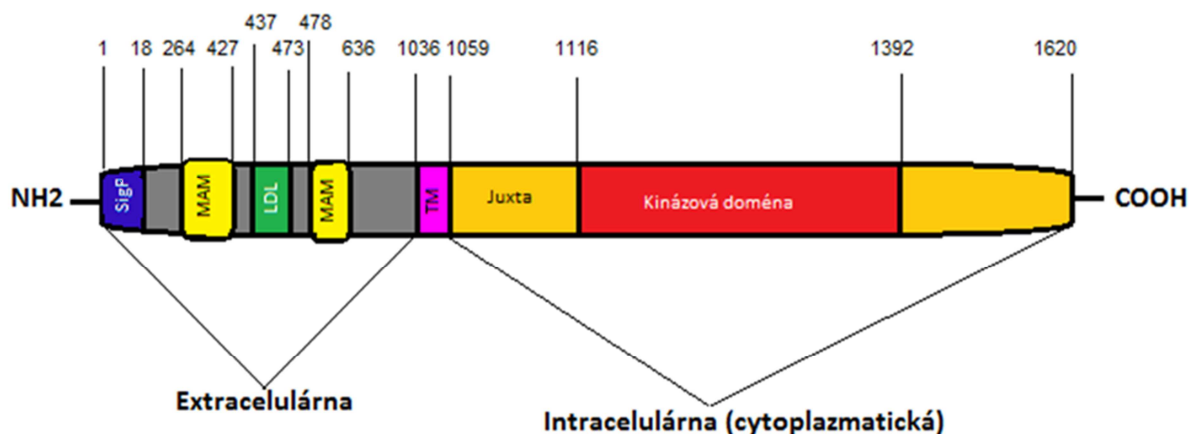
Posledným génom tejto štúdie je gén *ALK*. Leží na krátkom ramienku chromozómu 2, v pozícii 23 (2p23) (Obrázok č. 8), v rozpätí od bázových párov 29,192,773 po bázové páry 29,921,610 (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK>). Má 29 exónov v 728 838 bázach (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ALK>).



Obrázok č. 8: Lokalizácia génu *ALK* na chromozóme 2 (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK>).

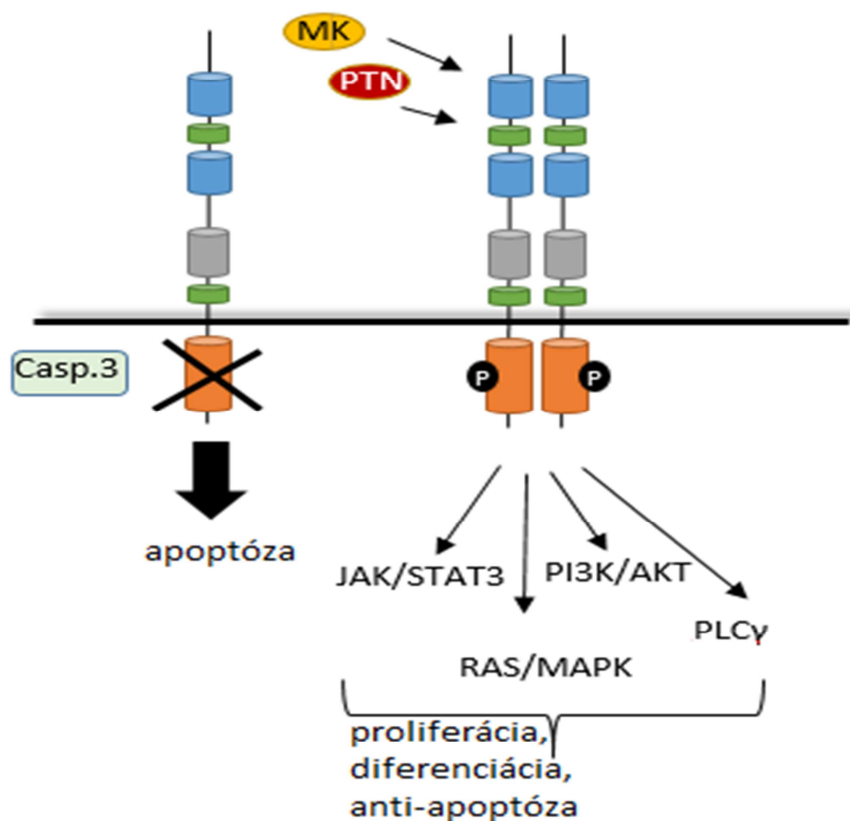
Dĺžka sekvencie je 1620 aminokyselín, pričom samotný reťazec *ALK* receptor tyrozín kinázy začína v 19. aminokyselinovom zvyšku. Sekvencia 1 – 18 patrí signálnemu peptidu. Reťazec tvoria alfa helixy a beta vlákna (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UM73>).

ALK gén kóduje anaplastickú lymfóm tyrozín kinázu, ktorá patrí do rodiny transmembránových receptorových tyrozín kináz (RTKs). Rovnako, ako ostatní členovia tejto rodiny, aj *ALK* sa skladá z extracelulárnej, transmembránovej a intracelulárnej oblasti. Extracelulárnu oblasť tvoria domény MAM1, LDLa a MAM2 a glycín bohatý región. Transmembránovú a intracelulárnu oblasť tvorí Juxta-membránová doména, doména tyrozín kinázy a C-terminálna doména (Obrázok č. 9) (Allouche a kol. 2010).



Obrázok č. 9: Štruktúra ALK tyrozín kinázy. Signálny peptid SigP (aminokyselinový zvyšok 1-18); v extracelulárnej doméne MAM domény (264-427 a 478-636), LDLa doména (437-473); transmembránový segment TM (1036-1059); v intracelulárnej doméne Juxta doména (1059-1116), kinázová doména (1116-1392) a C-terminálna doména (1392-1620) (Upravené podľa: Roskoski 2013).

RTKs, teda tiež ALK, zabezpečuje prenos informácie z povrchu bunky do jej vnútra takzvanou signálnou transdukciou. Tento proces je vyvolaný stimuláciou kinázy, ktorá je väčšinou zabezpečená naviazaním ligandu na extracelulárnu doménu receptora (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK>). Po väzbe ligandu sa kináza dimerizuje a dochádza k autofosforylácii intracelulárnej tyrozín kinázovej domény. Fosforyláciou sa spúšťa aktivita kinázy, ktorá prenáša fosfátovú skupinu na ďalšie proteíny určitých signálnych dráh vnútri bunky a tým zasa spúšťa ich aktivitu. ALK je teda súčasťou signálnych dráh zúčastňujúcich sa proliferácie a diferenciácie buniek (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK>). Jeho pôsobenie na bunku, či už proapopticky alebo antiapopticky, závisí na prítomnosti alebo neprítomnosti ligandu (Mourali a kol. 2006). Takými ligandami pre ALK boli navrhnuté pleiotrophin a midkine (Stoica a kol. 2001, 2002). Sú to rastové faktory, ktoré sú svojou štruktúrou a expresiou počas vývoja podobné ako ALK. Spúšťa dimerizáciu a fosforyláciu ALK a tým aktiváciu signálnej dráhy PI3K/AKT, ktorá stimuluje proliferáciu buniek. Väzba týchto ligandov na ALK aktivuje tiež inhibíciu apoptózy pomocou dráhy RAS-MAPK. Rovnako aktivuje dráhy JAK-STAT a PLCγ (Azarova a kol. 2011). V prípade neprítomnosti ligandu naopak pôsobí ALK pro-apoptoticky, a to prostredníctvom Kaspázy 3, ktorá štiepi a odhaľuje pro-apoptotickú ALK intracelulárnu doménu (Mourali a kol. 2006) (Obrázok č. 10). Priama funkcia ALK je zatiaľ iba predpokladom, a to, že hrá dôležitú úlohu vo vývoji a údržbe nervovej sústavy.



Obrázok č. 10: Kaspáza 3 (Casp.3) štípi intracelulárnu doménu ALK (anaplastic lymphoma receptor tyrozín kináza) a aktivuje pro-apoptotickú dráhu. Vázba ligandu MK/PTN (midkine/pleiotropin) spúšťa dimerizáciu a autofosforyláciu (P) intracelulárnych domén ALK. Aktivovaný fosforylovaný dimér spúšťa kaskádu signálnych dráh pre proliferáciu, diferenciáciu a potlačenie apoptózy (upravené podľa: Grande a kol. 2011).

4.3.3.1. ALK a nádorové ochorenia

Somatické mutácie, zahrňujúce translokáciu za vzniku fúzneho *ALK* génu, sú spojené s viacerými nádorovými ochoreniami (Palmer a kol. 2009). U anaplastického veľko – bunečného lymfómu (vysoké štádium non-Hodgkinovho lymfómu) je charakteristická fúzia génov *ALK* a *NPM1* (translokácia $t(2;5)(p23;q35)$). Ďalším ochorením súvisiacim s fúziou *ALK*u je NCSLC (nemalobunečný karcinóm pľúc). V tomto prípade ide o inverznú fúziu génov *ALK* a *EML4* (Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4) ($inv(2)(p21;p23)$) (Soda a kol. 2007). Iné chromozomálne prestavby, ktorých je *ALK* súčasťou, boli objavené tiež v prípadoch zápalových myofibroblastických nádorov, difúzných veľko B-bunečných lymfómoch a niektorých typov karcinómov pažeráka (Palmer a kol. 2009). Všetky zahŕňajú vznik fúzneho proteínu, ktorý zachováva funkciu oboch fúzovaných proteínov. Partnerský proteín, s ktorým *ALK* fúzuje, umožňuje fosforyláciu *ALK*u bez dimerizácie, čím zabezpečí

nepretržitú aktiváciu katalytickej domény ALKu (Allouche a kol. 2010). Vďaka tomu sú konštitutívne spustené signálne dráhy, ktorých sa ALK zúčastňuje, čo môže to viesť k zvýšeniu proliferácie nedozretých nervových buniek a následne k vzniku nádoru.

4.3.3.2. ALK a neuroblastóm

Dôležitá súvislosť s mutáciami génu *ALK* bola preukázaná aj v prípade neuroblastómu. Neuroblastóm môže vznikať nielen sporadicky, teda získanou mutáciou v *ALK* géne, ale môže mať aj formu zárodočnej mutácie. Zárodočná mutácia *ALK* génu sa dedí autozomálne dominantným spôsobom s neúplnou penetranciou a znamená pre jedinca zvýšené riziko vzniku neuroblastómu. Až u 80 % familiárnych neuroblastómov sa vyskytuje táto heterozygotná mutácia v onkogénne *ALK* (Liu a Thiele 2012). Medzi zistené zárodočné mutácie génu *ALK* patria R1275Q, R1192P a G1128A, pričom najčastejšia je R1275Q (substitúcia guanínu za alanín) (Janoueix-Lerosey a kol. 2008). V prípade sporadických neuroblastómov sa mutácie v *ALK* vyskytujú približne v 6 – 12 % (Greengard a kol. 2010). Bolo zistených 12 konzervatívnych polôh v oblasti tyrozín kinázovej domény, v ktorých sa vyskytujú aktivačné mutácie génu *ALK* (Wood a kol. 2009). Za hlavné hotspoty sú považované 2 mutačné miesta, a to R1275Q (substitúcia guanínu za adenín) a F1174L (substitúcia cytozínu za adenín alebo guanín) (Chen a kol. 2008). Obe tieto mutácie menia konformáciu reťazca, čím narušia stabilitu helixu a umožňujú, rovnako ako u ostatných nádorových ochorení, nepretržitú fosforyláciu ALK bez dimerizácie a následnú aktiváciu cieľových signálnych dráh (Lee a kol. 2010). Okrem bodových mutácií, bola zistená aj amplifikácia *ALK*, a to v približne 2 % prípadov neuroblastómov (De Brouwer a kol. 2011). Jednotlivé mutácie *ALK* génu sú však špecifické iba pre neuroblastómy vysokého rizika, nevyskytujú sa u pacientov stredného a nízkeho rizika. Výnimkou je mutácia F1174L, ktorá v spojení s amplifikáciou *MYCN* vykazuje výrazne zrýchlený nástup ochorenia a zlú prognózu prežitia (Martinsson a kol. 2011). Nedávne štúdie dokonca ukazujú, že v prípade zárodočnej línie je toto spojenie F1174L s *MYCN* letálne (De Brouwer a kol. 2010).

Všetky doterajšie zistenia a štúdie, zaoberajúce sa vzťahom medzi mutáciami *ALK* a spomínanými ochoreniami, dokazujú, že inhibíciou *ALK* expresie dochádza k výraznému poklesu proliferácie nádorových buniek (Janoueix-Lerosey a kol. 2008).

ALK sa preto javí ako dobrý terapeutický cieľ, pričom niekoľko inhibítorov *ALK* génu už prešlo, alebo prechádza predklinickými a klinickými štádiami. Ako prvý bol do klinických štúdií zahrnutý Crizotinib, ktorý vykázal veľmi dobré výsledky u pacientov s NSCLC (Azarova a kol. 2011) a ukazuje sa, že aj u pacientov s neuroblastómom s mutáciou R1275Q alebo amplifikáciou *ALK* (Wood a kol. 2009).

5. Materiál a metódy

5.1. Materiál použitý na analýzu

Materiálom pre analýzu boli vzorky nádorových tkanív, odobraných od pacientov s diagnostikovaným neuroektodermálnym nádorom. Pacienti boli liečení na Klinike detskej hematológie a onkológie UK 2. LF a FN Motol, 3. internej klinike VFN a 1. LF UK. Po diagnostikovaní nádoru boli vzorky odobrané chirurgom v podobe kúskov pevného nádorového tkaniva (resekciou) alebo prostredníctvom biopsie a následne zamrazené. Vzorky potrebné pre štúdium boli v molekulárno – biologickom laboratóriu spracované a bola z nich izolovaná DNA. Po overení kvality vyizolovanej DNA prostredníctvom spektrofotometra bola konkrétna vzorka nádorovej DNA použitá na vlastnú mutačnú analýzu.

K analýze bolo k dispozícii celkom 133 vzoriek rozdelených podľa typu neuroektodermálneho nádoru a študovaného génu. Rozdelenie ukazuje Tabuľka č.1.

Tabuľka č.1: Počet vyšetrených vzoriek na študované gény u jednotlivých nádorov.

typ nádoru	celkový počet vzoriek	vyšetovaný gén (počet vzoriek)
neuroblastóm	26	<i>BRAF</i> (23), <i>ALK</i> (7)
meduloblastóm	31	<i>BRAF</i> (31), <i>CTNNB1</i> (6)
feochromocytóm	47	<i>BRAF</i>
nádory mozgu	29	<i>BRAF</i>

Primery, použité na analýzu génu *ALK* boli navrhnuté v rámci medzinárodnej štúdie Proposition of SOPs (Adapted from the SOPs of the Neuroblastoma study group of the SFCE Gudrun Schleiermacher, June 2014) a zahŕňajú exóny 23 a 25. *Primery* pre exóny 2 – 4 génu *β-katenín(CTNNB1)* boli navrhnuté podľa štúdie vykonanej Legoix a kol. v roku 1999. Pre exón 15 v géne *BRAF* bol *forward primer* navrhnutý podľa Venesio a kol. z roku 2013 a *reverse primer* Zdenkom Musilom podľa programu Primer 3. Konkrétne sekvencie zobrazuje Tabuľka č.2.

Tabuľka č.2: Sekvencie *primerov* génov *ALK*, *CTNNB1* a *BRAF*.

gén	primer	sekvencia
ALK ex 23	ALK EX23FP	GGAGCCTGCTGTGGTTCTTC
	ALK EX23RP	AGTTGACACCCTGGGTTCC
ALK ex 25	ALK EX25FP	GGAAATATAGGGAAGGGAAGGAACTA
	ALK EX25RP	TGATGTAAGGGACAAGCAGCC
CTNNB1 ex 2-4	CTNNB1 EX2FP	GAAATCCAGCGTGGACAATG
	CTNNB1 EX4RP	TCGAGTCATTGCATACTGTCC
BRAF ex 15	BRAF FP	TTGACTCTAAGAGGAAAGATGAAGT
	BRAF RP	CTGTTCAAACCTGATGGGACCC

5.2. Izolácia DNA z tkanív (Purgene)

Purgene izolácia využíva vysoťovaciú zrážaciú metódu prostredníctvom kitu Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany). Bunky sú lyzované s aniontovým detergentom za prítomnosti stabilizátoru DNA, ktorý zamedzuje činnosť DNáz. RNázy odstránia RNA a proteíny a nečistoty sú odstránené zrazením solí. Genomová DNA je následne izolovaná vyzrážaním s alkoholom a je rozpustená v hydratačnom roztoku. Postup izolácie pozostáva z viacerých krokov a všetky použité chemikálie sú dodané od firmy Qiagen (Düsseldorf, Germany).

Biosan thermo-shaker zahrejeme na 55°C. Z mrazeného alebo čerstvého tkaniva odoberieme 5 – 10 mg, mechanicky dezintergrujeme skalpelom a dáme do skúmavky s objemom 1,5 ml. K vzorke tkaniva pridáme 300 µl Cell Lysis Solution a premiešame pomocou vortexu, čím sa zabezpečí lýza buniek. Do skúmavky pridáme 1,5 µl Puregene Proteinase K (degradácia proteínov) a miešame invertovaním (obracaním) 25-krát. Nasleduje inkubácia na prístroji Biosan zahriatom na 55°C po dobu 3 a viac hodín (lepšie cez noc), kým tkanivo nie je úplne rozpustené. Počas inkubácie je potrebné skúmavku pravidelne invertovať. V prípade použitia Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Germany) nie je nutné vzorku obracať, tento krok nahradíme zapnutím vortexovania na 700 otáčok na 3 a viac hodín.

Centrifúgu Centrifuge 5430R (Eppendorf, Hamburg, Germany) necháme schlaďiť na 4°C. Do vzorky pridáme 1,5 µl RNase A Solution (degradácia RNA) a miešame invertovaním 25-krát. V tomto prípade nie je možné vzorku vortexovať. Vzorku inkubujeme po dobu 30 minút pri 37°C a následne 1 minútu na ľade, čo umožní rýchle schladenie. Pridáme 100 µl Protein Precipitation Solution a miešame

vortexom na najvyššie otáčky 20 sekúnd. Skúmavku premiestnime do centrifúgy schladenej na 4°C a pri tejto teplote centrifugujeme pri 20 817 x g 3 minúty. Dôjde k zrazeniu proteínov, ktoré vytvoria úzku viditeľnú peletu. Do čistej skúmavky odoberieme supernatant zo skúmavky s proteínovou peletou a znova centrifugujeme pri 20 817 x g 3 minúty pri 4°C. Do ďalšej čistej skúmavky si napipetujeme 300 µl izopropanolu a pridáme supernatant, ktorý pipetou odoberieme z predchádzajúcej skúmavky. Skúmavku so supernatantom a izopropanolom invertujeme aspoň 50-krát, kým sa nevyzráža viditeľné biele vlákno. Centrifúgu nastavíme na izbovú teplotu, vložíme skúmavku a centrifugujeme pri 20 817 x g 2 minúty. Supernatant odsajeme a skúmavku opatrne osušíme buničnou vatou. Pridáme 20 až 100 µl DNA Hydravion Solution, pričom množstvo závisí od veľkosti pelety. Zvortexujeme 5 sekúnd a inkubujeme 1 hodinu pri 65°C. Následne necháme vzorku inkubovať cez noc pri miernom trepaní a izbovej teplote, čo zabezpečí že sa DNA rozpustí.

Kvalitu a koncentráciu izolovanej DNA zistíme pomocou spektrofotometra NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware). Koncentrácia, meraná absorbanciou žiarenia pri vlnovej dĺžke 260 nm, musí byť minimálne 30 ng/µl. Čistota DNA, určená pomerom absorbie pri vlnovej dĺžke 260 nm a 280 nm, musí byť v rozsahu 1,7 – 1,95. V prípade, že namerané hodnoty zodpovedajú tejto požiadavke, môžu byť použité k ďalšiemu postupu.

5.3. Sekvenovanie

5.3.1 PCR reakcia

Vzorku DNA, určenú na amplifikáciu, nariedime na koncentráciu 50 ng/µl v TE pufre do celkového objemu 2,5 µl. Potrebné chemikálie dodané výrobcom (Applied Biosystem®; Waltham, Massachusetts, USA) necháme pri izbovej teplote roztopiť a premiešame pomocou vortexu. Na ľade si do čistej skúmavky z príslušných reagentov pripravíme PCR master mix podľa tabuľky č.3.

Tabuľka č.3: Príprava PCR master mixu pre 1 reakciu.

reagenty pre prípravu PCR master mixu	1 reakcia	
H ₂ O	18	μl
PCR pufoer s SO ₄	2,5	μl
MgCl ₂ 25mM	1,5	μl
dNTP mM	0,5	μl
FP (<i>forward primer</i>)10mM	0,5	μl
RP (<i>reverse primer</i>) 10mM	0,5	μl
Polymeráza Fermentaz	0,2	μl

Reakčnú zmes zvortexujeme a pripravíme skúmavky (ependorfky) určené pre PCR, ktoré označíme podľa študovaných vzoriek. Do každej ependorfky pridáme 23,7 μl master mixu a 0,35 μl príslušnej DNA vzorky. Prenesieme do *termocycleru* Labcycler VERITI 96 well thermal cycler (Sensoquest, Gottinger, Germany) na program určený pre PCR reakciu (tabuľka č.4).

Tabuľka č.4: Program pre PCR reakciu.

počet cyklov	čas	teplota
1	3 min	94°C (počiatočná denaturácia dsDNA)
35	30 s	94°C (denaturácia dsDNA)
	30 s	60°C (nasadenie <i>primerov</i>)
	45 s	72°C (predlžovanie <i>primerov</i>)
1	5 min	72°C (dodyntetizovanie)

V prípade, že vzorka nebude spracovaná hneď, je možné ju týždeň udržiavať pri 4°C, na dlhšie uchovávanie je potrebné vzorku zamraziť na -15 až -25°C.

5.3.2 Elektroforéza

Pripravíme si 1,5% gél na elektroforézu rozmiešaním 0,4 g agarózy v 25 ml 100x zriedeného pufru TBE a zahriatím v mikrovlnke. Teplú zmes nalejeme do dopredu pripravenej a vyváženej doštičky. Podľa počtu vzoriek pridáme hrebeň alebo dva (vytvorenie jamiek) a necháme stuhnúť. Stuhnutý gél vložíme do vaničky, pričom musí byť celý ponorený v TAE. Pripravíme si 2 μl vkladacieho pufru TopBio (koncentrovaný PCR Blue buffer) (Top-Bio, s.r.o., Vestec, Česká republika) pre každú vzorku (napipetovaním na papierik), ktorý zabezpečí vizualizáciu priebehu elektroforézy a klesnutie vzoriek na dno gélu. Po skončení PCR reakcie pridáme k TopBio pufru 8 μl z každého PCR produktu (amplikón) a premiešame pipetou. Veľkostný marker Ready-Load™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies™, Grand

Island, USA) a amplikóny zmiešané s pufrom nanesieme na gél a pustíme elektroforézu na 30 minút na 90 V. Po prebehnutí reakcie gél opatrne vložíme do nádoby s ethidium bromidom (EtBr) na 15 minút, následne opláchneme v nádobe s vodou a pozorujeme pomocou transluminátora UV Transluminator 2000, 240 V a programu Quantity One 4.1.0 (Bio-Rad, Richmond, California) prítomnosť/neprítomnosť DNA (pruhy).

5.3.3 Sekvenačná PCR

V prípade, že elektroforéza potvrdila prítomnosť naamplifikovanej DNA, pokračujeme v sekvenácii so získanými amplikónmi.

Pripravíme si 2 sady ependorfiek, ktoré si odlíšime rozdielnym značením. Jedna sada je určená pre *forward primer*, druhá pre *reverse primer*. Pri izbovej teplote necháme roztopiť chemikálie potrebné pre reakciu (dodané výrobcom Applied Biosystem[®]; Waltham, Massachusetts, USA) a pripravíme z nich 2 master mixy, jeden s použitím *forward primeru* (FP), druhý s *reverse primeru* (RP). Postupujeme podľa tabuľky č.5a a 5b.

Tabuľka č.5a: Príprava master mixu pre *forward primer* (F).

reagenty pre <i>forward primer</i> mix	1 reakcia	
H ₂ O	2,4	μl
Sekvenačná zmes - BigDye Terminátor v 3.1	2,0	μl
FP	0,3	μl

Tabuľka č.5b: Príprava master mixu pre *reverse primer* (R).

reagenty pre <i>reverse primer</i> mix	1 reakcia	
H ₂ O	2,4	μl
Sekvenačná zmes - BigDye Terminátor v 3.1	2,0	μl
RP	0,3	μl

Namiešané master mixy rozdelíme do pripravených a príslušne označených sád ependorfiek po 4,7 μl. K master mixu pridáme 0,35 μl PCR produktu (z kroku 1.), pričom na každý PCR produkt pripadajú 2 ependorfky (jedna zo sady *Forward*, druhá zo sady *Reverse*). Prenesieme do *termocycleru* Labcycler VERITI 96 well thermal cycler (Sensoquest, Gottinger, Germany) na pripravený program pre sekvenačnú PCR (tabuľka č.6).

Tabuľka č.6: Program pre sekvenačnú PCR.

počet cyklov	čas	teplota
1	2 min	96°C (počiatočná denaturácia dsDNA)
25	20 s	96°C (denaturácia dsDNA)
	10 s	50°C (nasadenutie <i>primerov</i>)
	4 min	60°C (predlžovanie <i>primerov</i>)
1	1 min	60°C (dosyntetizovanie)

Po skončení reakcie je potrebné vzorku ihneď, maximálne na druhý deň (skladovanie v chladničke do 4°C), prečistiť.

5.3.4 Čistenie po sekvenačnej PCR

Do čistej skúmavky pripravíme mix z NaOAc (acetát sodný) a EtOH 96% (etanol) podľa tabuľky č.7.

Tabuľka č.7: Príprava mixu na prečistenie.

reagenty pre čistiaci mix	1 reakcia	
NaOAc acetát sodný (3M)	0,5	μl
EtOH 96%	12,5	μl

Do každej skúmavky s PCR produktom z predchádzajúceho kroku pridáme 13 μl namiešaného mixu a necháme 10 - 15 minút pri izbovej teplote. Vzorky centrifugujeme v centrifúge Centrifuge 5430R (Eppendorf, Hamburg, Germany) pri izbovej teplote pri 20 817 x g po dobu 30 minút. Po centrifugácii zo skúmavok odstriekneme tekutinu do buničnej vaty, pričom precipitát je usadený na dne a nie je vidieť. Následne si pripravíme čerstvý 70% EtOH a do každej skúmavky pridáme 60 μl. Znova centrifugujeme pri 20 812 x g po dobu 10 minút pri izbovej teplote. Tekutinu zo skúmaviek odstriekneme do buničnej vaty a opakujeme pridanie 70% EtOH do každej vzorky a následnú centrifugáciu pri 20 817 x g za izbovej teploty po dobu 10 minút. Nasleduje odstrieknutie do buničnej vaty a premiestnenie skúmavok do *termocycleru* Labcycler VERITI 96 well thermal cycler (Sensoquest, Gottinger, Germany) na vysušenie pri teplote 40°C po dobu 10 minút. Počas sušenia nechávame víka eppendorfiiek otvorené. Po vysušení priamo v *termocyclery* pridáme ku každej vzorke 30 μl formamidu Hi-Di^{FM} (Applied Biosystem[®]; Waltham, Massachusetts, USA), víka zavrieme a spustíme program denaturácie pri 95°C po dobu 5 minút. Takto pripravená vzorka sa môže analyzovať v sekvenátore hneď, alebo do 7 dňoch pri skladovaní v chladničke do 4°C. V prípade neskoršej analýzy

ako po 7 dňoch, je potrebné vzorku uložiť do mrazničky na -15 až -25°C obalenú v alobale alebo tmavom boxe.

5.3.5 Príprava vzorky na fragmentačnú analýzu

Do jamiek čistej doštičky The MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystem®; Waltham, Massachusetts, USA), určenej na sekvenáciu, pridáme celý obsah pripravených ependorfiek z predchádzajúceho kroku (do každej jamky jeden prečistený PCR produkt). Doštičku prekryjeme fóliou na PCR. Vzorky sa môžu analyzovať hneď, alebo môžu byť skladované 2 dni v chladničke pri teplote 4°C.

5.3.6 Kapilárna elektroforéza a analýza

Pripravené vzorky v The MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystem®; Waltham, Massachusetts, USA) analyzujeme pomocou automatického sekvenátora ABI 3130/3130xl HITACHI (Applied Biosystem®; Waltham, Massachusetts, USA). Získané dáta sú vyhodnotené pomocou programu Mutation Surveyor® software a porovnané s referenčnými sekvenciami vybranými k príslušným génom (*BRAF* - NC_000007.14; *ALK* - NC_000002.12; *β-katenín (CTNNB1)* - NG_013302.1).

5.4. MLPA

Priebeh vyšetrenia vzoriek prostredníctvom MLPA je zložený z viacerých krokov rozdelených do dvoch dní:

5.4.1 DNA denaturácia a hybridizácia Salsa prób (1. deň)

Reagenty potrebné na prípravu master mixu (dodané výrobcom MRC Holland, Amsterdam, Netherland) necháme roztopiť pri izbovej teplote. Vzorky DNA nariedime na koncentráciu 50 ng/μl. Riedime v TE pufre do celkového objemu 2,5 μl. V rovnakom objeme použijeme pozitívnu kontrolu SD043 Sample DNA. Skúmavky s nariedenými vzorkami DNA a pozitívnou kontrolou prenesieme do *termocycleru* Labcycler VERITI 96 well thermal cycler (Sensoquest, Gottinger, Germany)

a zahrievame, teda denaturujeme, pri 98°C po dobu 5 minút. Dobu zahrievania je možné predĺžiť až na 30 minút. Pred otvorením *termocycleru* znížime teplotu na 25°C a vzorky na túto teplotu schladíme. Po prebehnutí denaturácie si pripravíme hybridizačný master mix podľa tabuľky č.8.

Tabuľka č.8: Príprava hybridizačného master mixu pre 1 reakciu.

reagenty pre hybridizačný master mix	1 reakcia	
SALSA MLPA P370 BRAF-IDH1 IDH2 Probemix (čierne viečko)	0,75	μl
MLPA buffer (žlté viečko)	0,75	μl

MLPA buffer je nutné pred použitím premiešať pomocou vortexu. Po ochladení vzoriek v *termocyclery* na 25°C, ku každej z nich pridáme 1,5 μl hybridizačného master mixu a rozmiešame pipetou. Naleduje rýchle schladenie vzoriek na ľade, aby sa zabránilo renaturácii a inkubácia v *termocyclery* najprv 1 minútu pri teplote 95°C, potom 16 až 20 hodín pri teplote 60°C. Tento krok prebieha cez noc.

5.4.2 Ligačná reakcia (2. deň)

Po inkubácii vzoriek 16 až 20 hodín v *termocyclery* znížime teplotu z 60°C na 54°C, čo zabezpečí prípravu vzoriek na ligáciu, tzv. pre-ligácia. Necháme roztopiť potrebné chemikálie (MRC Holland, Amsterdam, Netherland) pre prípravu ligačného master mixu Ligase-65 a do čistej skúmavky ho namiešame podľa tabuľky č.9.

Tabuľka č.9: Príprava ligačného master mixu pre 1 reakciu.

reagenty pre master mix Ligase-65	1 reakcia	
dH ₂ O	12,5	μl
Ligase buffer A (transparentné viečko)	1,5	μl
Ligase buffer B (biele viečko)	1,5	μl
Ligase enzým-65 (zelené viečko)	0,5	μl

Ligase buffer A a Ligase buffer B je nutné pred použitím zvortexovať. Ku každej vzorke v *termocyclery*, schladeného na teplotu 54°C, pridáme 16 μl Ligase-65 master mixu a pipetou premiešame. Následne necháme 15 minút inkubovať pri teplote 54°C. Počas tejto inkubácie prebieha ligácia. Potom *termocycler* zahrejeme na teplotu 98°C a necháme inkubovať 5 minút. Po skončení inkubácie schladíme vzorky v *termocyclery* na 20°C a vyberieme. Ak nebudeme pracovať so vzorkami hneď ďalej, je možné ich skladovať 7 dní v chladničke pri teplote 4°C.

5.4.3 PCR reakcia (2. deň)

Roztopíme reagenty (dodané výrobcom MRC Holland, Amsterdam, Netherland) potrebné na namiešanie polymeračného master mixu, ktorý pripravujeme na ľade (tabuľka č.10).

Tabuľka č.10: Príprava polymeračného master mixu pre 1 reakciu.

reagenty pre Polymerase master mix	1 reakcia	
dH ₂ O	3,75	μl
SALSA PCR <i>primer</i> mix (hnedé viečko)	1,5	μl
SALSA polymeráza (oranžové viečko)	1,5	μl

SALSA PCR *primer* mix sa musí pred použitím zvortexovať a SALSA polymerase 10 sekúnd zahrievať v ruke. K vzorkám z predchádzajúceho kroku pridáme pri pokojovej teplote 5 μl namiešaného Polymerase master mixu a pipetou rozmiešame. Vzorky preniesieme do *termocycleru* na program pre PCR reakciu (tabuľka č.11).

Tabuľka č.11: Program pre PCR reakciu na MLPA.

počet cyklov	čas	teplota
35	30 s	95°C
35	30 s	60°C
35	1 min	72°C
1	20 min	72°C

Po ukončení PCR reakcie je možné vzorky analyzovať hneď. Pre analýzu do 7 dní je potrebné uskladnenie v chladničke pri 4°C, pre dlhšiu dobu ako týždeň je nutné vzorku zamraziť na -15 až -25°C v alobale alebo v tmavom boxe.

5.4.4 Príprava vzorky na fragmentačnú analýzu (2. deň)

Pri izbovej teplote necháme roztopiť potrebné chemikálie (dodané výrobcom Applied Biosystem[®]; Waltham, Massachusetts, USA) pre prípravu master mixu Formamid HiDi^{FM} podľa tabuľky č.12.

Tabuľka č.12: Príprava Formamid HiDi^{FM} master mixu pre 1 reakciu.

reagenty pre master mix Formamid HiDi ^{FM}	1 reakcia	
Formamid HiDi ^{FM}	12,0	μl
Gene scan ROX 350/LIZ	1,5	μl

Do jamiek čistej doštičky The MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystem[®]; Waltham, Massachusetts, USA) pridáme 12 μl master

mixu Formamid MiDi a 1 µl MLPA produktu. Takto pripravenú doštičku prekryjeme fóliou na PCR. Vzorky sa môžu analyzovať hneď, alebo môžu byť skladované 2 dni v chladničke pri teplote 4°C.

5.4.5 Kapilárna elektroforéza a analýza

Analýza prebieha prostredníctvom automatického sekvenátora ABI 3130/3130xl HITACHI (dodané výrobcom Applied Biosystem[®]; Waltham, Massachusetts, USA). Získané dáta sú následne hodnotené v programe Coffalyser.Net a konečné sekvencie porovnávané s príslušnou referenčnou sekvenciou a pozitívnou kontrolou Binning DNA for P370-B BRAF-IDH1 IDH2.

6. Výsledky

Vzorky, získané biopsicky alebo resekciou od pacientov s diagnostikovaným neuroektodermálnym typom nádoru, boli rozdelené podľa typu nádoru a študovaného génu. Jednotlivé skupiny boli následne analyzované pomocou molekulárne genetických metód, buď priamou sekvenáciou alebo metódou MLPA.

Všetky vyšetrované vzorky boli sekvenované z oboch strán, aby sa zabezpečilo vylúčenie nešpecifícít, pričom za pozitívny výsledok bol považovaný len ten, ktorý vykazoval mutáciu z obidvoch strán. Nepreukázali sme žiadne polymorfizmy mimo sledovaných hotspot mutácií a toto obojstranné sekvenovanie zabezpečilo dostatočne dôveryhodný výsledok, takže nebolo nutné použiť kontroly. Väčšina vzoriek bola osekvenovaná raz, opakované vyšetrenie bolo vykonané len v prípade nekvalitných vzoriek, ktoré po prvotnej sekvenácii vykázali podozrivý výsledok bez jasného nálezu.

6.1. Detekcia mutácie BRAF génu

Pre analýzu vzoriek na dôkaz prítomnosti alebo neprítomnosti mutácie v géne *BRAF* bol k dispozícii najväčší počet vzoriek z viacerých typov neuroektodermálnych nádorov. Konkrétne neuroblastómu, meduloblastómu, feochromocytómu a nádorov mozgu. V prípade prvých troch bola na analýzu použitá metóda klasického Sangerovho sekvenovania, u nádorov mozgu metóda MLPA. Dôvodom výberu metódy MLPA, v prípade nádorov mozgu gliálneho pôvodu, bola možnosť tejto metódy na zachytenie *IDH1*, *IDH2* mutácií a chromozomálnych zmien, typických pre tieto ochorenia. Naopak sekvenácia bola pre vyšetrenie NBL, MBL a FEO použitá kvôli tomu, aby mohla byť preukázaná aj minoritná mutácia génu *BRAF*. Cieľom záujmu diplomovej práce bola konkrétne substitučná mutácia V600E, ktorá je označovaná ako hotspot. Ide o transverziu 1799T>A v kodóne 15, pri ktorej dochádza k zámene valínu za kyselinu glutámovú (bližšie v kapitole 4.3.2). Výsledky boli porovnávané s referenčnou sekvenciou NC_000007.14.

6.1.1 Pacienti s neuroblastómom

Klasifikácia neuroblastómov podľa schémy, vytvorenej Brodeurom v roku 1997, udáva rozdelenie pacientov do 3 skupín. Prognosticky priaznivé sú skupiny I a IIA, skupina IIB sa vyznačuje zlou prognózou. Klasifikácia podľa Brodeura je založená na molekulárno – biologickej podstate (priblížené v kapitole 4.2.3). Systém INSS (The International Neuroblastoma Staging System) z polovice 90-tych rokov udáva rozdelenie neuroblastómu založené na lokalizácii, veľkosti, rozsahu, prítomnosti metastáz a stave lymfatických uzlín. Charakterizuje neuroblastóm do 4 skupín (*staging*), na priaznivé skupiny I, IIA, IIB, IVs a nepriaznivejšie alebo metastatické štádia III a IV. Pri zohľadnení oboch typov klasifikácií, jak molekulárno – biologickú tak histologickú charakteristiku, sa neuroblastómy radia do skupiny LR (nízke riziko), SR (stredné riziko) alebo HR (vysoké riziko).

Vzorky, zahrnuté do tejto štúdie pochádzajú od pacientov zo všetkých klasifikovaných skupín ochorenia. V celkovom počte vzoriek (23), ktoré boli k dispozícii pre detekciu mutácie V600E, nebol preukázaný pozitívny výsledok ani v jednom prípade (Tabuľka č.13).

Tabuľka č.13 : Výsledky sekvenácie mutácie V600E génu *BRAF* u pacientov s neuroblastómom.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	<i>BRAF</i> (V600E)	štádium
č.1	M	0,05	NBL	neg	štádium 1
č.2	M	0,07	NBL	neg	štádium 2
č.3	M	0,12	NBL	neg	štádium 2
č.4	M	0,53	NBL	neg	štádium 1
č.5	F	0,77	ganglio NBL	neg	štádium 1
č.6	M	0,99	NBL	neg	štádium 2
č.7	M	1,03	NBL	neg	štádium 1
č.8	M	1,06	NBL	neg	štádium 2
č.9	F	1,50	NBL	neg	štádium 3
č.10	M	1,74	NBL	neg	štádium 4
č.11	M	1,90	NBL	neg	štádium 3
č.12	M	1,91	NBL	neg	štádium 2
č.13	F	2,06	NBL	neg	štádium 3
č.14	M	2,50	NBL	neg	štádium 3
č.15	F	2,52	ganglio NBL	neg	štádium 3
č.16	M	2,93	NBL	neg	štádium 4
č.17	M	3,22	NBL	neg	štádium 3
č.18	M	3,36	NBL	neg	štádium 2

č.19	F	3,59	NBL	neg	štádium 3
č.20	M	3,79	NBL	neg	štádium 2
č.21	M	3,80	NBL	neg	štádium 4
č.22	M	4,46	NBL	neg	štádium 3
č.23	M	5,63	NBL	neg	štádium 4

Skupinu vzoriek od pacientov s diagnostikovaným neuroblastómom, ktorá bola použitá pre vlastnú analýzu, tvorilo 23 jedincov. Z celkového počtu muži výrazne prevládali nad ženami, konkrétne 18 mužov (M) nad 5 ženami (F). Všetci, okrem 2 pacientov (91,3 %), vykazovali v dobe diagnostiky vek pod 4 roky. Diagnóza bola pacientom stanovená vo veku v priemere 2,15 rokov. Vo štvrtom štádiu ochorenia, podľa klasifikácie systémom INSS, boli 4 pacienti. Do skupiny tretieho štádia patrilo 8 pacientov a do druhého štádia 7 pacientov. Štyria pacienti sa nachádzali v štádiu 1 tohto ochorenia. Dvaja pacienti mali diagnostikovaný ganglioneuroblastóm, ktorý sa vyznačuje vysokým stupňom diferenciácie. Všetci ostatní pacienti mali v rámci diagnózy stanovený neuroblastóm (NBL).

6.1.2 Pacienti s meduloblastómom

Pacienti s diagnostikovaným meduloblastómom, ktorý patrí medzi embryonálne neuroektodermálne nádory, sú, podľa WHO klasifikácie z roku 2007, rozdelení do 4 skupín na základe typu nádoru. Do 1. skupiny patrí klasický meduloblastóm, do 2. desmoplastický, do 3. meduloblastóm s extenznou nodularitou a do 4. skupiny patrí anaplastický meduloblastóm. Všetky meduloblastómy zároveň vykazujú stupeň malignity (*grade*) 4, ktorý sa vyznačuje agresívnym rastom, výrazne abnormálnymi bunkami a nízkou úspešnosťou liečby (Louis a kol. 2007).

Pre sekvenovanie, s cieľom určiť prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF*, bolo k dispozícii 31 vzoriek od pacientov s diagnostikovaným meduloblastómom. Rovnako, ako pri neuroblastóme, boli všetky vzorky negatívne na prítomnosť študovanej mutácie (Tabuľka č.14).

Tabuľka č.14: Výsledky sekvenácie mutácie V600E génu *BRAF* u pacientov s meduloblastómom.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	<i>BRAF</i> (V600E)	typ nádoru a <i>grade</i>
č.1	M	13,20	MBL	neg	<i>grade</i> 4
č.2	F	5,22	MBL	neg	<i>grade</i> 4
č.3	M	1,59	MBL	neg	<i>grade</i> 4

č.4	F	3,22	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.5	M	6,85	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.6	F	2,48	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.7	F	0,29	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.8	F	9,12	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.9	M	1,09	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.10	F	16,91	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.11	M	10,63	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.12	M	4,33	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.13	M	14,81	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.14	F	9,52	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.15	F	7,10	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.16	M	8,66	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.17	F	9,96	MBL	neg	anaplastický, <i>grade 4</i>
č.18	M	9,22	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.19	F	12,46	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.20	F	11,67	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.21	M	4,19	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>
č.22	M	18,06	MBL	neg	desmoplastický, <i>grade 4</i>
č.23	M	17,21	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.24	F	1,76	MBL	neg	s extenzívnou nodularitou, <i>grade 4</i>
č.25	M	2,06	MBL	neg	desmoplastický, <i>grade 4</i>
č.26	M	9,96	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>
č.27	M	6,14	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>
č.28	M	13,26	MBL	neg	<i>grade 4</i>
č.29	M	10,29	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>
č.30	M	3,98	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>
č.31	M	8,63	MBL	neg	klasický, <i>grade 4</i>

Celkový počet vzoriek od pacientov s meduloblastómom (31) tvorilo 19 mužov (61,3%) a 12 žien (38,7%), teda muži prevládali, čo potvrdzuje údaje v literatúre o všeobecnej charakteristike meduloblastómu. Priemerný vek v dobe diagnostikovania ochorenia bol 8,19 rokov. Najmladší pacient bol vo veku 0,29 a najstarší vo veku 18,06 rokov. U všetkých pacientov bol stanovený stupeň malignity (*grade*) číslo 4, u 10 pacientov bol podľa WHO klasifikácie stanovený aj typ nádoru, u zvyšných 21 nebol typ bližšie definovaný. Ani v jednom prípade neboli prítomné metastázy, čo je v prípade meduloblastómu typické.

6.1.3 Pacienti s feochromocytómom

V prípade diagnostikovania feochromocytómu sú pacienti rozdeľovaní do dvoch skupín podľa miesta vzniku a iných identifikačných parametrov, konkrétne do skupiny klasického feochromocytómu a skupiny paragangliomu (kapitola 4.2.4). Po osekvenovaní všetkých dostupných vzoriek od pacientov, nebola nepotvrdená prítomnosť mutácie V600E v *BRAF* géne ani v jednom prípade, teda výsledok sekvenácie pre túto mutáciu bol u všetkých pacientov negatívny (Tabuľka č.15).

Tabuľka č.15: Výsledky sekvenácie mutácie V600E génu *BRAF* u pacientov s feochromocytómom.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	<i>BRAF</i> (V600E)
č.1	F	36,98	FEO	neg
č.2	M	17,59	FEO	neg
č.3	F	13,03	FEO	neg
č.4	F	33,75	PARA	neg
č.5	M	50,33	FEO	neg
č.6	F	12,68	FEO	neg
č.7	F	35,30	FEO	neg
č.8	F	77,24	FEO	neg
č.9	M	6,73	FEO	neg
č.10	F	63,49	FEO	neg
č.11	M	14,54	FEO	neg
č.12	M	34,84	FEO	neg
č.13	F	31,13	FEO	neg
č.14	M	52,54	bilaterálny FEO	neg
č.15	F	59,61	FEO	neg
č.16	M	23,41	FEO	neg
č.17	M	59,39	FEO	neg
č.18	F	26,99	FEO	neg
č.19	M	61,68	FEO	neg
č.20	M	76,61	FEO	neg
č.21	M	53,61	FEO	neg
č.22	M	13,05	FEO	neg
č.23	M	26,21	FEO	neg
č.24	F	65,77	FEO	neg
č.25	M	40,11	bilaterálny FEO	neg
č.26	M	40,01	FEO	neg
č.27	F	67,83	FEO	neg
č.28	F	67,32	FEO	neg
č.29	F	76,97	FEO	neg
č.30	F	25,30	FEO	neg

č.31	M	19,90	FEO	neg
č.32	M	26,46	PARA	neg
č.33	F	65,54	FEO	neg
č.34	F	15,04	FEO	neg
č.35	M	46,76	FEO	neg
č.36	M	42,96	FEO	neg
č.37	F	75,91	PARA	neg
č.38	F	32,89	FEO	neg
č.39	F	57,64	FEO	neg
č.40	M	50,21	FEO	neg
č.41	F	61,53	FEO	neg
č.42	M	51,00	FEO	neg
č.43	F	9,66	FEO	neg
č.44	F	14,26	FEO	neg
č.45	M	74,78	FEO	neg
č.46	F	73,47	PARA	neg
č.47	M	59,43	FEO	neg

Celkový počet vzoriek bol 47. Z tohto súboru pacientov mali 4 z nich diagnostikovaný paragangliom (PARA) a zvyšných 43 feochromocytóm (FEO). Dvaja zo skupiny FEO sa vyznačovali prítomnosťou bilaterálneho FEO. Percentuálne vyjadrenie výskytu v našej skupine je 8,51 % PARA a 91,49 % FEO (pomer 1:10,75), pričom všeobecne udávaný výskyt PARA a FEO je v pomere približne 15 % : 85 % prípadov (pomer 1:5,67). Počet mužov bol 23 a žien 24, čo je približne 50 : 50. Táto skutočnosť potvrdzuje fakt, že výskyt feochromocytómu sa medzi pohlaviami nerozlišuje. Postihnutí sú väčšinou jedinci vo veku od 30 do 50 rokov. Priemerný vek v tejto skupine pacientov je 43,44 rokov, čo spadá do tohto rozmedzia.

6.1.4 Pacienti s nádorom mozgu

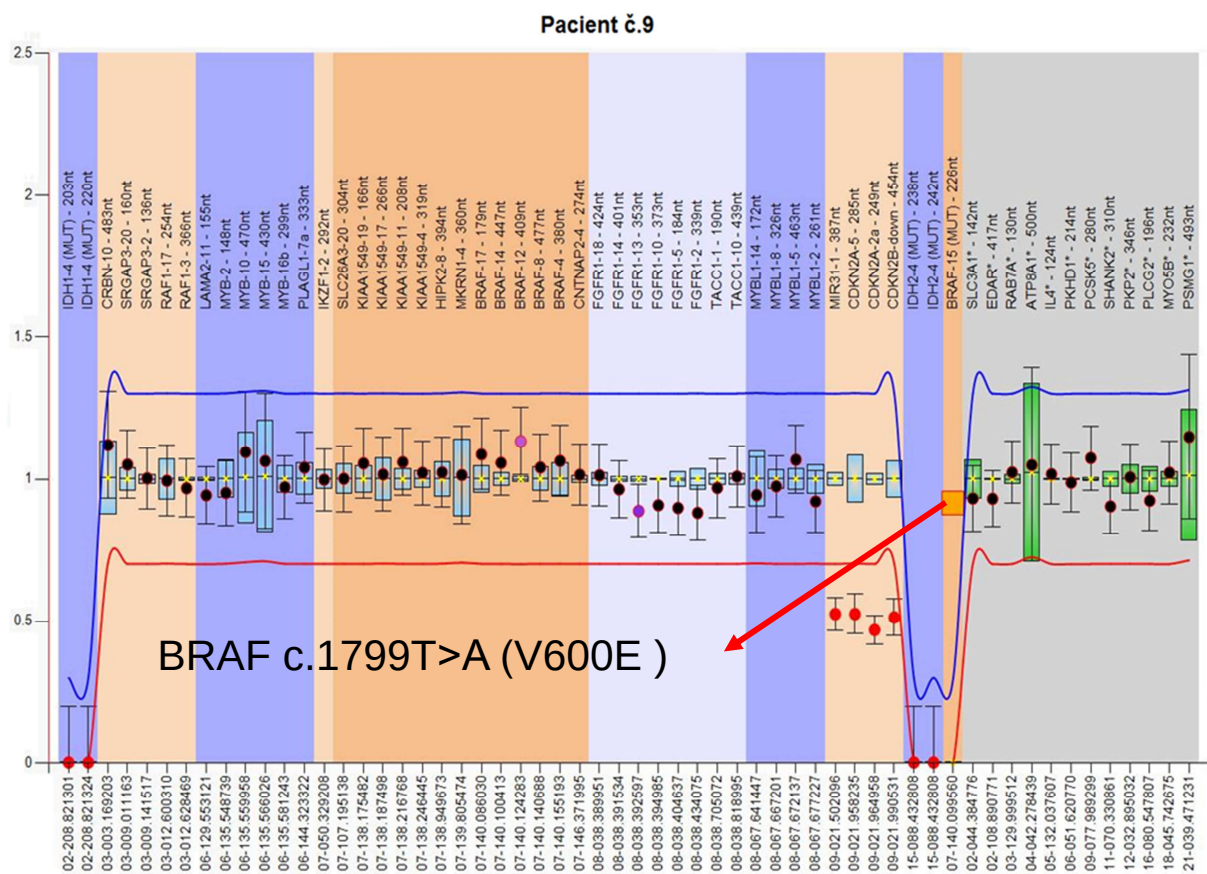
Zo skupiny nádorov mozgu boli dostupné 4 glioblastómy, 4 gangliogliomy a v najväčšom počte astrocytomy, ktorých bolo 21. Vzorky boli vyšetrované metódou MLPA s použitím kitu P370, pomocou ktorého bola, okrem iného detegovaná, mutácia V600E v géne *BRAF*, na ktorú je táto práca zameraná. Výsledky ukazuje Tabuľka č.16.

Tabuľka č.16: Výsledky mutácie V600E génu *BRAF* pomocou MLPA u pacientov s nádormi mozgu.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	grade	<i>BRAF</i> V600E (kit P370)
č. 1	F	0,13	astrocytóm	<i>grade 2</i>	neg
č. 2	F	1,28	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg
č. 3	M	2,01	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg
č. 4	F	2,60	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg (<i>gain 7q34</i>)
č. 5	M	3,13	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg (<i>gain 7q34</i>)
č. 6	M	3,48	astrocytóm	<i>grade 2</i>	neg (<i>gain 7q34</i>)
č. 7	M	6,01	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg
č. 8	M	6,07	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg (<i>gain 7q34</i>)
č. 9	F	7,66	astrocytóm	<i>grade 2</i>	poz (V600E)
č. 10	M	9,12	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg
č. 11	M	9,29	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg (<i>gain 7q34</i>)
č. 12	F	9,98	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg
č. 13	F	10,29	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg (<i>gain 7q34</i>)
č. 14	F	11,28	astrocytóm	<i>grade 3</i>	neg
č. 15	F	11,29	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg
č. 16	M	11,93	astrocytóm	<i>grade 3</i>	neg
č. 17	F	15,91	astrocytóm	<i>grade 1</i>	neg
č. 18	M	17,14	astrocytóm	<i>grade 3</i>	poz (V600E)
č. 19	M	17,79	astrocytóm	<i>grade 2</i>	neg
č. 20	F	18,41	astrocytóm	<i>grade 3</i>	neg
č. 21	M	21,16	astrocytóm	<i>grade 2</i>	neg
č. 22	F	3,37	glioblastóm	<i>grade 4</i>	neg
č. 23	M	4,88	glioblastóm	<i>grade 4</i>	neg
č. 24	M	33,39	glioblastóm	<i>grade 4</i>	neg (<i>gain 7q34</i>)
č. 25	F	33,73	glioblastóm	<i>grade 4</i>	neg (<i>gain 7q34</i>)
č. 26	M	9,95	gangliogliom	<i>grade 1</i>	neg (<i>gain 7q34</i>)
č. 27	M	11,61	gangliogliom	<i>grade 1</i>	neg
č. 28	F	11,81	gangliogliom	<i>grade 1</i>	neg
č. 29	F	18,88	gangliogliom	<i>grade 2</i>	neg

Celkový počet vzoriek bol 29, pričom pomer mužov a žien bol 15 : 14 a priemerný vek 11,16 rokov. Pacienti s glioblastómom mali všetci klasifikovaný stupeň malignity 4, traja pacienti s gangliogliomom vykazovali *grade 1* a jeden *grade 2*. V prípade astrocytómu bol stanovený *grade 1* (12 pacientov), *grade 2* (5 pacientov) a *grade 3* (4 pacienti). Pomocou kitu P370 bola potvrdená prítomnosť mutácie V600E u dvoch pacientov s astrocytómom (č.9 a č.18) (Obrázok č.11), z ktorých jeden mal stupeň malignity 2 a druhý 3. U zvyšných 27 pacientov bol výsledok na detekciu mutácie V600E negatívny. 9 pacientov ale vykázalo *gain 7q34*,

konkrétne v exónoch 19, 17, 11, 4 génu *KIAA1549* a exónoch 17, 14, 12, 8, 4 génu *BRAF* a predpokladom je, že to viedlo k vzniku fúzneho génu *KIAA1549/BRAF* a tým aktivácii onkogénneho *BRAF*.



Obrázok č.11: Výsledok MLPA potvrdzujúci prítomnosť mutácie V600E v exóne 15 génu *BRAF* u pacienta č.9.

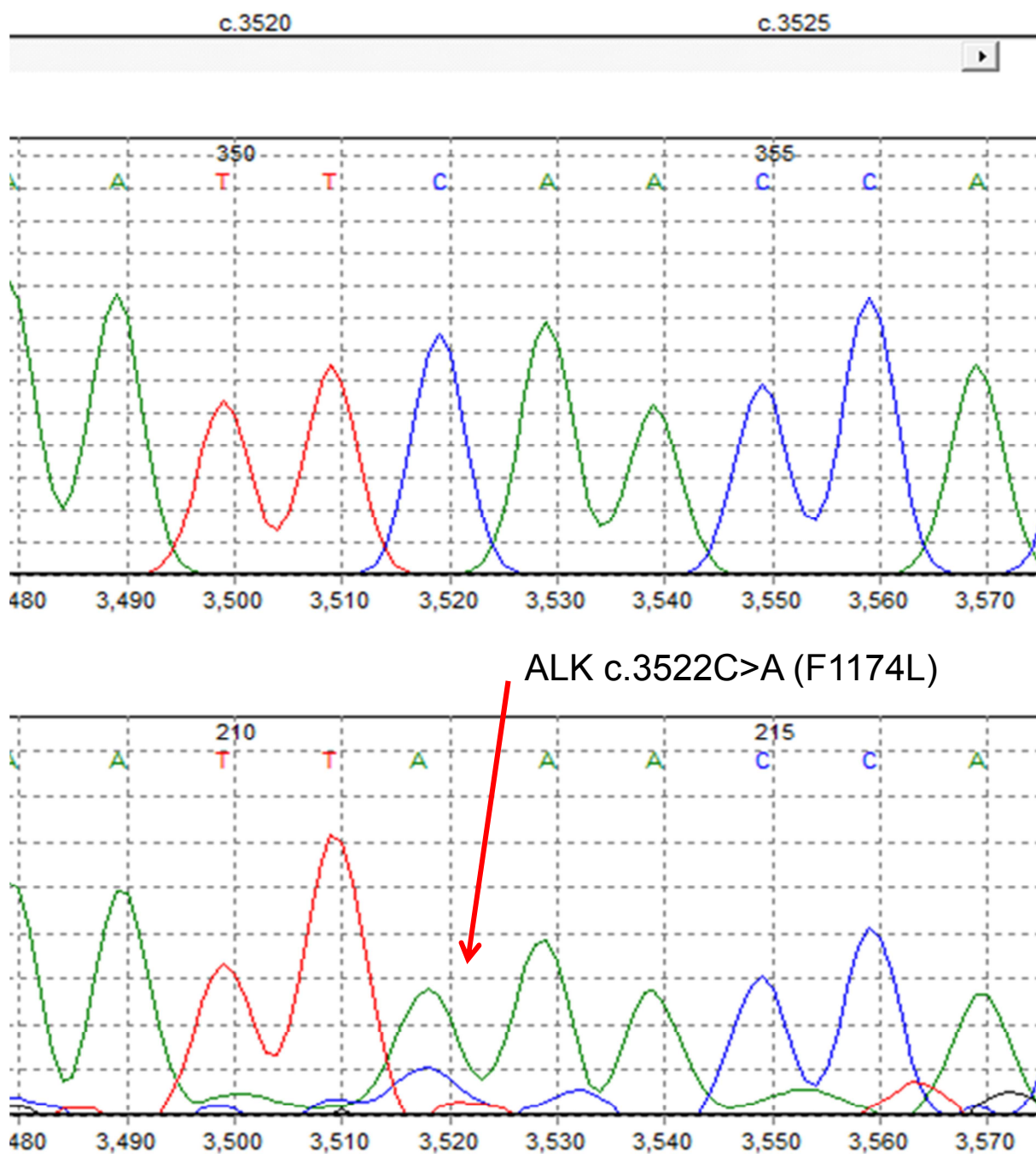
6.2. Detekcia mutácie *ALK* génu sekvenovaním

Pri detekcii mutácie génu *ALK* bola cieľom skupina vybraných pacientov s diagnostikovaným neuroblastómom. Konkrétnym predmetom záujmu v rámci *ALK* génu boli exóny 23 a 25, v ktorých sú mutačné miesta považované za hotspots (kapitola 4.3.3). Doposiaľ získané výsledky, ktoré boli vyhodnotené porovnaním s referenčnou sekvenciou NC_000002.12, ukazuje Tabuľka č.17. Ďalšie vzorky sú stále v procese vyšetrovania.

Tabuľka č.17: Výsledky sekvenácie mutácií v exóne 23 a 25 génu *ALK* u pacientov s neuroblastómom.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	klinické štádium	<i>ALK</i> 23 exón	<i>ALK</i> 25 exón
č.1 (17)	M	3,22	NBL	štádium 3	neg	neg
č.2 (19)	F	3,59	NBL	štádium 4	neg	neg
č.3	M	0,69	NBL	štádium 4	neg	neg
č.4	F	1,93	NBL	štádium 4	neg	neg
č.5	F	3,27	NBL	štádium 4	neg	neg
č.6 (5)	M	0,77	ganglio NBL	štádium 1	neg	neg
č.7 (18)	M	3,36	NBL	štádium 3-4	neg	poz (c.3522C>A p. F1174L)

Vyšetrených pacientov bolo celkové množstvo 7, pričom 4 z nich boli súčasťou skupiny pre detekciu mutácie *BRAF* génu (číslo pacienta v zátvorke zodpovedá číslu pacienta v Tabuľke č.13). Muži v tejto vybranej skupine prevládali s počtom 5 nad ženami v počte 2. Pacienti sa nachádzali v rôznych štádiách ochorenia, jeden v treťom štádiu, 1 vo štvrtom štádiu a 1 medzi 3. a 4. štádiom ochorenia. Jednému pacientovi bol diagnostikovaný ganglioneuroblastóm a nachádzal sa v prvom štádiu ochorenia. Sekvenácia bola vykonaná na dvoch exónoch (23 a 25) v géne *ALK* so zameraním na 2 substitučné mutačné miesta. V exóne 23 to bolo miesto R1275Q, ktorého sekvenácia v prípade všetkých vzoriek vykázala negatívny výsledok. Naopak, pozitívny výsledok v mutačnom mieste F1174L exónu 25 bol potvrdený u pacienta č.7 (Obrázok č.11). U ostatných, doposiaľ vyšetrených pacientov, bol výsledok negatívny.



Obrázok č.11: Výsledok sekvenácie potvrdzujúci prítomnosť substitučnej mutácie ALK F1174L u pacienta č.7, porovnaním s referenčnou sekvenciou NC_000002.12.

6.3. Detekcia mutácie génu β -katenín sekvenovaním

Výber vzoriek pre sekvenovanie génu β -katenín (*CTNNB1*) bol cielene zameraný na pacientov s diagnózou meduloblastómu. V tomto prípade je dôležité zohľadnenie rozdelenia pacientov podľa klasifikácie, ktorú publikoval Taylor a kol. v roku 2011 a je založená na molekulárno – genetickom základe, konkrétne na chromozómových aberáciách typických pre jednotlivé skupiny. Tá rozdeľuje

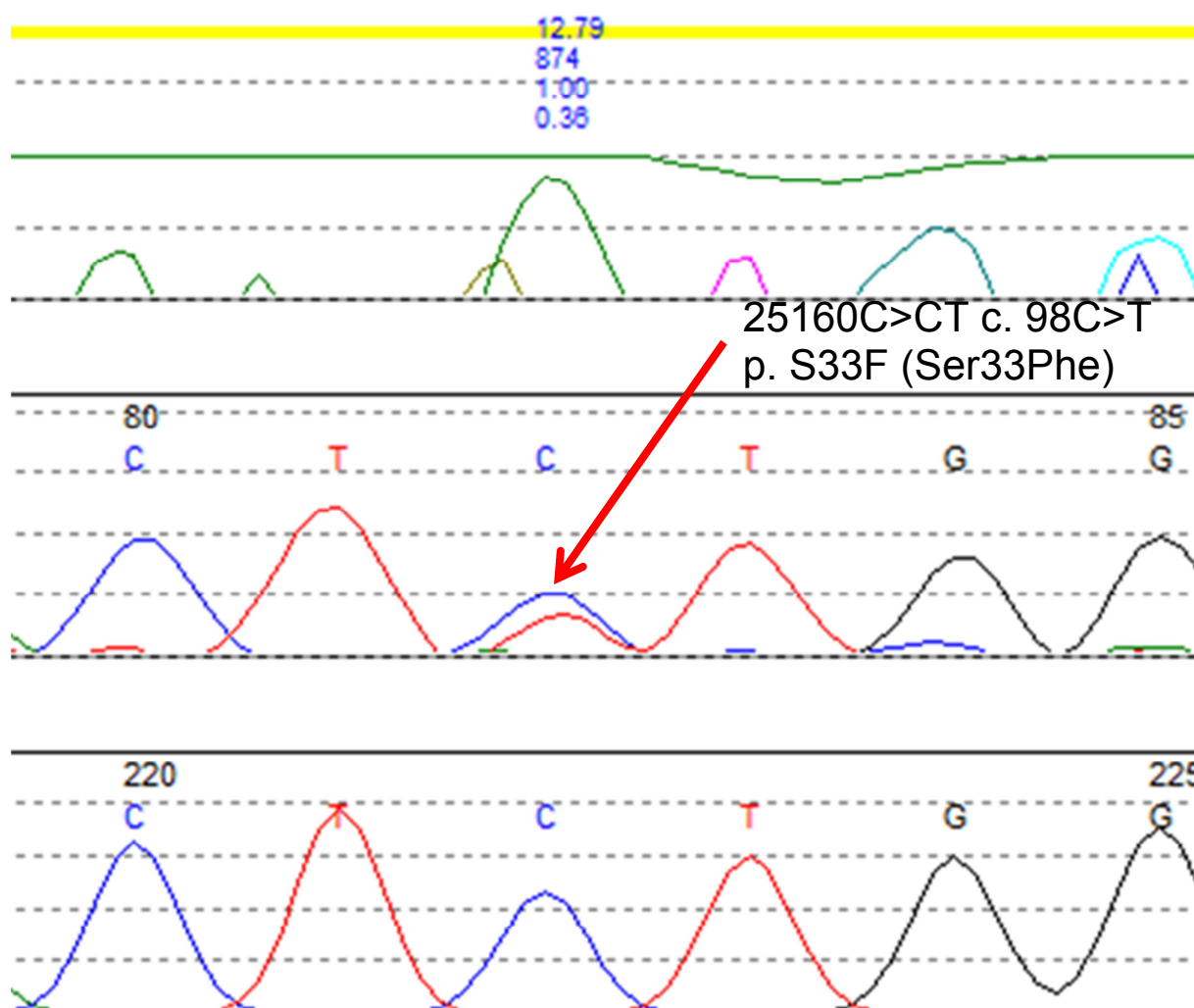
pacientov do štyroch skupín I - IV, pričom I. skupina je charakteristická práve mutáciou v β -*katenín* (bližšie popísané v kapitole 4.2.2.1).

Pacienti boli vybraní po predchádzajúcom vyšetrení pomocou metódy FISH (Fluorescence in situ hybridization) a MLPA, pričom hlavným kritériom bolo potvrdenie delécie celého chromozómu 6. Práve monozómia 6 je predpokladom prítomnosti mutácie v géne β -*katenín*. Výsledky boli porovnávané s referenčnou sekvenciou NG_013302.1. Vybraní pacienti boli testovaní aj na prítomnosť mutácie V600E génu *BRAF* (číslo pacienta zodpovedá číslu pacienta v Tabuľke č.14). Výsledky zobrazuje Tabuľka č.18.

Tabuľka č.18: Výsledky sekvenácie mutácií génu β -*katenín* u pacientov s meduloblastómom s potvrdenou monozómiou chromozómu 6.

pacient	pohlavie	vek v dobe diagnostiky	diagnóza	typ nádoru a grade	β - <i>katenín</i>
č.8	F	9,12	MBL	grade 4	neg
č.13	M	14,81	MBL	grade 4	neg
č.14	F	9,52	MBL	klasický, grade 4	poz (c.101G>T p.G34V)
č.15	F	7,1	MBL	grade 4	poz (c.98 C>T p.S33F)
č.19	F	12,46	MBL	grade 4	poz (c.97C>T p. S33P; c.111T>C p. S37S)
č.31	M	8,63	MBL	klasický, grade 4	poz (c.98 C>T p.S33F)

Počet vzoriek bol 6, z čoho muži boli dvaja a ženy štyri. Priemerný vek diagnostikovania ochorenia bol 10,27 rokov. Potvrďuje to klinické údaje o výskyte mutácie β -*katenínu* vo Wnt skupine meduloblastómov, ktoré uvádzajú vyšší vek pacientov, no nie vek nad 16 rokov. U pacientov č.8 a č.13 nebola potvrdená prítomnosť mutácie génu β -*katenín*, aj napriek prítomnej delécie chromozómu 6. Ostatní pacienti zo študovanej skupiny vykázali pozitívny výsledok, čím sa potvrdila prítomnosť mutácie v β -*kateníne* (c.98 C>T p.S33F). Obrázok č.12 zobrazuje pozitívny výsledok u pacienta č.31.



Obrázok č.12: Výsledok priamej sekvenácie u pacienta č.31 porovnávaný s referenčnou sekvenciou NG_013302.1 (dole).

7. Diskusia

Neuroektodermálne nádory, konkrétne nádory CNS, patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce nádory u detí, no sú prítomné aj u dospievajúcich a dospelých jedincov. Práca sa zamerala na najpočetnejšie nádory z tejto skupiny, a to meduloblastóm, neuroblastóm a vybrané nádory mozgu. Do štúdie bol zaradený aj feochromocytóm, ktorý nepatrí do skupiny nádorov CNS, ale rovnako vzniká z neuroektodermu. Na základe rovnakého pôvodu bola predpokladaná možnosť spoločných príčin vzniku nádoru, ako u ostatných študovaných tumorov. U neuroblastómu a meduloblastómu sú známe prognostické ukazovatele v podobe mutácií konkrétnych génov, na základe ktorých sa určuje ich molekulárne - biologická klasifikácia. Práve na detekciu týchto mutácií sa v súčasnosti sústreďujú štúdie, a to s cieľom zavedenia inhibítorov mutovaných génov ako vhodnejšej liečby. Rovnako cieľom práce bolo preukázanie mutácií u 3 génov (*BRAF*, *ALK* a *β-katenín*), ktoré sú spájané s príčinami vzniku vybraných nádorových ochorení. Jedná sa o somatické mutácie, germinálne mutácie študované neboli. U *ALK* génu to bolo kvôli tomu, že nebola k dispozícii germinálna DNA a súhlas pacientov s jej vyšetrením do tejto štúdie, ani súhlas etickej komisie a nebolo to cieľom tejto práce. V prípade génu *BRAF* a *β-katenín* bolo dôvodom to, že sa v týchto génoch germinálne mutácie nevyskytujú. S tým súvisí aj to, že nenádorové bunky pacientov sú negatívne, pričom ani všetky nádorové bunky nemusia mať prítomnú preukázanú mutáciu. Táto heterogénna populácia komplikuje jednoznačný dôkaz mutácie a závisí na pomere mutovanej a nemutovanej alely v celkovom obsahu vyizolovanej DNA. Upresnenie by mohlo priniesť využitie „deep NGS“ (Next Generation Sequencing) sekvenácie, kde je možné spoľahlivejšie preukázať aj prítomnosť malého klonu nádorových buniek s mutáciou.

Vyšetrených bolo celkom 133 vzoriek z vyššie uvedených nádorov, pričom najväčší počet bol použitý na detekciu mutácie v géne *BRAF*. Jedná sa o mutáciu V600E, ktorá je považovaná za hotspot, zabezpečuje zvýšenú kinázovú aktivitu proteínu B-raf a tým transformačnú aktivitu buniek. Podstatou je aminokyselinová substitúcia valínu za kyselinu glutámovú, ktorú zapríčiňuje transverzia v kodóne 600, konkrétne v exóne 15 (1799T>A) (Davies a kol. 2002).

Fakt, že mutácia V600E pokrýva približne 80 až 90 % vyskytujúcich sa *BRAF* mutácií (Rubinstein a kol. 2010), bol jedným z dôvodov, prečo bola diplomová práca na tento hotspot zameraná. Davies a kol. v roku 2002 potvrdili prítomnosť *missence* mutácie V600E u 66 % zo skupiny vyšetovaných pacientov s malígnym melanómom, ktorý takisto patrí medzi neuroektodermálne nádory. Následné štúdie vykázali o niečo menší výskyt (37 až 50 %) tejto mutácie u melanómu (Hodis a kol. 2012, Maldonado a kol. 2009). Prítomnosť mutácie V600E zvyšuje účinnosť *BRAF* inhibítorov, ktorých je v súčasnosti na trhu viacero a v prípade melanómu sa ukazujú ako veľmi účinné. Prvým personalizovaným inhibítorom bol Vemurafenib od firmy Roche (Basel, Switzerland), ktorého účinnosť u 48 % liečených pacientov s melanómom preukázal v štúdií Chapman a kol. (2011). U nádorov s preukázanou mutáciou *BRAF* V600E prebieha niekoľko klinických štúdií na overenie citlivosti týchto inhibítorov, vrátane terapie mozgových nádorov. Výsledky týchto štúdií však nie sú v súčasnosti dostupné.

Tieto pozitívne výsledky viedli k rozšíreniu štúdií na iné nádory vznikajúce z neuroektodermy, vychádzajúce z podobnosti pôvodu s melanómom. Shukla a kol. v roku 2011 publikoval štúdiu, ktorá zahŕňala identifikáciu mutácií onkogénov u neuroblastómu pomocou Sangerovho sekvenovania. Okrem iných, bol súčasťou štúdie aj gén *BRAF*, ktorého mutáciu V600E bola potvrdená v 1 % zo 192 vyšetrených vzoriek neuroblastómu. Táto štúdia prvýkrát načrtla možnosť, že by mutácia V600E mohla zohrávať úlohu vo vzniku neuroblastómu, na čo nadviazala táto práca. Z 23 vzoriek, ktoré boli s touto diagnózou k dispozícii, nebola nepreukázaná očakávaná prítomnosť mutácie V600E v žiadnom z prípadov. Nepreukázanie pozitívneho výsledku je prikladané malému počtu vyšetrených vzoriek, naďalej je však predpokladaný podiel mutácie V600E na vzniku niektorých prípadov neuroblastómov. Na potvrdenie tohto predpokladu ďalej prebiehajú štúdie. Z doposiaľ vyšetrených pacientov, 91,3 % spĺňalo v dobe diagnostiky hranicu veku 4 roky, ktorú literatúra udáva až u 88 % prípadov neuroblastómu (Stephens a Aigner 2009). Najmladší pacient mal vek 0,05 rokov, nachádzal sa v štádiu 1 a podľa National Cancer Institute SEER programu z roku 1999 mal lepšiu prognózu na prežitie, a to z dôvodu diagnostiky ochorenia vo veku menej ako 1 rok, čo sa potvrdilo a pacient stále žije. Najstarší pacient mal 5,63 rokov, spadol do 4. klinického štádia a podľa údajov z programu SEER 1999 horšiu prognózu prežitia

kvôli stanoveniu diagnózy nad 5 rokov. Rovnako aj táto prognóza sa potvrdila, pacient je už po smrti.

Do skupiny pre detekciu mutácie V600E bolo zahrnutých aj 31 vzoriek meduloblastómu a to aj napriek tomu, že na prítomnosť *BRAF* mutácie v súvislosti s týmto nádorovým ochorením neboli publikované žiadne výsledky. Cieľom bolo zistiť možnú prítomnosť mutácie V600E génu *BRAF* v meduloblastóme ako jedného zo skupiny neuroektodermálnych nádorov. Všetky vyšetrené vzorky vykázali negatívny výsledok, čím tento predpoklad nebol potvrdený a nepodarilo sa preukázať novú skutočnosť v súvislosti s génom *BRAF* a príčinou tohto malígneho ochorenia.

Podobne ani u feochromocytómu, ktorý nepatrí medzi nádory CNS, nebola, napriek najväčšiemu počtu vzoriek – 47, preukázaná prítomnosť mutácie V600E v géne *BRAF*. V prípade vzniku tohto ochorenia bolo doposiaľ preukázaných 18 génov (Vícha a kol. 2013), ktoré sa na ňom podieľajú. Jochmanová a kol. v roku 2014 potvrdili prítomnosť mutácií, okrem iných, v onkogénoch *K-RAS* a *H-RAS*, ktoré sú súčasťou signálnej dráhy MAPK, rovnako ako gén *BRAF*. Aj na základe tejto skutočnosti bolo cieľom práce overiť možný výskyt mutácie V600E v prípade feochromocytómu, čo sa nepodarilo.

V roku 2012 Myung a kol. vykonali štúdiu zameranú na prítomnosť mutácie V600E génu *BRAF* u 223 vzoriek nádorov CNS (astrocytóm, ganglioglióm, glioblastóm, xantoastrocytóm a oligodendrocytóm). Potvrdili prítomnosť tejto mutácie v 36 prípadoch (16,1 %), pričom najväčší výskyt bol zaznamenaný u gangliogliómu (23,5 %) a astrocytómu s WHO stupňom malignity I (15,6 %). Sledovaná vzorka pre túto diplomovú prácu obsahovala 29 pacientov, z čoho bolo 21 astrocytómov, 4 glioblastómy a 4 gangliogliomy. Pomocou molekulárno – cytogenetickej metódy MLPA s použitím komerčného kitu P370 bola u dvoch pacientoch (6,8 %) potvrdená prítomnosť očakávanej mutácie *BRAF* V600E. Obaja pacienti mali diagnostikovaný astrocytóm (2/21, 9,5 %), jeden muž a jedna žena. Pacientka mala stanovený pilocytický astrocytóm, teda WHO *grade* I, čo zodpovedá tvrdeniam štúdií (Dougherty a kol. 2010, Schindler a kol. 2011, Myung a kol. 2012) o výskyte mutácie *BRAF* génu u nízkych *gradov* (WHO I a II) astrocytómu. Naopak, pacient s pozitívnou mutáciou V600E túto skutočnosť vyvracia, pretože má stanovený WHO stupeň malignity III. U ostatných typov vyšetrených nádorov CNS nebola potvrdená prítomnosť očakávanej mutácie, čo je pripisované nízkemu počtu vyšetrených pacientov. V prípade rozšírenia množstva vzoriek však pretrváva predpoklad prítomnosti

viacerých pozitívnych prípadov. Keďže bol na detekciu použitý komerčný kit P370, ktorý je navrhnutý aj na zachytenie tandemovej duplikácie 7q34 zahrňujúcu gén *KIAA1549* (exóny 19, 17, 11, 4) a gén *BRAF* (exóny 17, 14, 12, 8, 4), dôsledkom ktorej je fúzia *BRAF-KIAA1549*, bol podaný nepriamy dôkaz prítomnosti tejto fúzie. Prítomnosť tejto fúzie bola preukázaná v 60 – 80 % pilocytického astrocytómu (Jones a kol. 2009, Dahiya a kol. 2012). V tejto práci bola prítomnosť získavej mutácie 7q34 potvrdená u 5 (23,8 %) prípadov astrocytómu, z čoho 4 mali stupeň malignity I a jeden *grade* II, čo potvrdilo tvrdenia o výskyte u nízkych štádií ochorenia. Tri glioblastómy s *gradom* IV a jeden gangliogliom s *gradom* I taktiež vykázal získavú mutáciu 7q34. Tieto zistenia však neboli predmetom záujmu a primárnym cieľom tejto práce a bližšie sa na ne zamerala iná, momentálne prebiehajúca štúdia, ktorej sa osobne nezúčastňujem.

Ďalším cieľom tejto práce bolo preukázanie mutácie v géne *ALK* so zameraním na exóny 23 a 25. Viaceré štúdie sa v posledných rokoch sústredili na *ALK* mutácie ako jednu z možných príčin vzniku a vývoja neuroblastómu. V roku 2008 Chen a kol. vyšetrili 215 pacientov s týmto tumorom, pričom preukázali *missense* mutácie *ALK* génu v 13 prípadoch (6,1 %). Všetci pozitívni pacienti sa nachádzali v 3. – 4. štádiu ochorenia a mutácie, ktoré sa všetky nachádzali v kinázovej doméne, zabezpečili zvýšenie kinázovej aktivity. Iná štúdia, ktorú paralelne s vyššie spomenutou vykonal George a kol. v roku 2008, vykázala prítomnosť *ALK* mutácie u 7 z 93 vzoriek (8 %), pričom 4 zo 7 pozitívnych (57,1 %) mali substitučnú mutáciu F1174L. Pre túto štúdiu boli vybrané vzorky s potvrdenou prítomnosťou *MYCN* amplifikácie, čo podľa klasifikácie Brodeura z roku 1997 identifikuje vysoké štádium ochorenia (štádium 3 a 4). Na základe uvedených štúdií boli vymedzené hotspotové mutačné miesta R1275Q (kodón 1275 v exóne 25) a F1174L (kodón 1174 v exóne 23). Práve substitučná mutácia F1174L, ktorá zamieňa fenylalanín za leucín, sa v spoločnom výskyte s *MYCN* amplifikáciou ukazuje ako veľmi zlý prognostický faktor a príčina urýchlenia nástupu a priebehu ochorenia. Greengard a kol. v roku 2010 zhrnuli dáta z dovtedy vykonaných prác na detekciu mutácií génu *ALK* a stanovili incidenciu ich výskytu na 6 – 12 %. V tejto práci vykazujem výsledok z priamej sekvenácie zo 7 vyšetrených prípadov neuroblastómov, vybraných na základe potvrdenia prítomnosti amplifikácie *MYCN* metódou FISH. U jedného pacienta mužského pohlavia bol potvrdený predpoklad preukázaním pozitívneho výsledku na prítomnosť mutácie v exóne 23 (c.3522C>A p.F1174L). V percentuálnom vyjadrení je to 14,2 %, čo

prevyšuje percento incidencie udávané vo vyššie uvedených prácach. Tento rozdiel odôvodňujem malým počtom testovaných vzoriek. Rovnaký pacient bol testovaný aj na prítomnosť mutácie V600E *BRAF* génu, ktorá ale nebola nepreukázaná. Tento výsledok potvrdzuje tvrdenie Shukla a kol. z roku 2011, hovoriace o prítomnosti mutácie *BRAF* len v prípade, že nie je prítomná mutácia *ALK*. Keďže táto časť práce je súčasťou medzinárodnej štúdie (SIOPEN Biology group study – the determination of genomic *ALK* status in NB), ktorá ešte nie je ukončená, ďalšie výsledky v rámci tejto diplomovej práce nemohli byť zverejnené.

Na trhu existuje už viacero inhibítorov zameraných na onkogénne aktívny *ALK*, ktoré sú zatiaľ v predklinickom štádiu s výnimkou jedného, s názvom Crizotinib. Crizotinib je malá molekula pôsobiaca ako inhibítor fosforylácie *ALK* kinázovej domény a jeho onkogénnej, permanentne fosforylovanej varianty (Hy a kol. 2007). The U.S. Food and Drug Administration (FDA) dňa 26. augusta v roku 2011 schválila Crizotinib na liečbu pacientov s NSCLC vo vysokom štádiu ochorenia (lokálne pokročilé alebo metastatické štádium), ktorí vykazujú mutáciu v *ALK* géne. Toto schválenie prijalo v súvislosti s NSCLC, okrem Spojených Štátov, aj niekoľko ďalších krajín. V súčasnosti sa testovanie účinnosti tohto inhibítora sústreďuje aj na iné typy nádorov, zahŕňajúc neuroblastóm, ktorý je súčasťou medzinárodnej štúdie pod ktorú táto časť diplomovej práce spadá. Po potvrdení pozitívneho výsledku prítomnosti mutácie F1174L v prípade pacienta č.7, mu bola nasadená liečba Crizotinibom, pričom pacient bol už v dobe 2. relapsu a bola vyčerpaná štandardná protokolárna liečba. Ako udáva Hy a kol. (2007), účinok tohto inhibítora bol malý, v prípade výskytu mutácie F1174L u NSCLC, čo sa potvrdilo aj v prípade pacienta č.7 s neuroblastómom, kedy liečba Crizotinibom nezabrala a pacient je momentálne v poslednej fáze ochorenia, v štádiu umierania. Potvrdzuje to aj tvrdenia práce z roku 2009 (Wood a kol.), ktoré hovoria o ukazujúcej sa účinnosti inhibítora Crizotinib u neuroblastómu, v prípade výskytu mutácie *ALK* génu v mutačnom mieste R1275Q. Je potrebné podrobnejšie preskúmanie jednotlivých kritérií a účinnosti *ALK* inhibítorov, ako potenciálny prostriedok liečby u vybraných typov nádorov. Je však potrebné rátať s pravdepodobnosťou vytvorenia rezistencie voči týmto liečivám, z dôvodu predpokladu objavenia nových bodových mutácií v *ALK* kinázovej doméne.

K výberu posledného génu - β -katenínu (*CTNNB1*) pre diplomovú prácu viedli viaceré štúdie vykonané v súvislosti s meduloblastómom.

V roku 1998 Zurawell a kol. preukázali prítomnosť mutácie *β -katenínu* v 4,5 % prípadov (3 zo 67 vzoriek). Huang a kol. v roku 2000 v ďalšej štúdii na detekciu mutácie *β -katenínu* u sporadického meduloblastómu, potvrdili výskyt v prípade 4 zo 46 vyšetrených pacientov (8,6 %), pričom sa vyskytovali najmä u detí mladších ako 16 rokov. Následné práce potvrdzovali tieto tvrdenia a priniesli aj nové skutočnosti. Fattet a kol. v roku 2009 vyšetřili 72 pacientov s diagnostikovaným meduloblastómom a u 6 z nich (8,3 %) preukázali mutáciu *β -katenínu*. U 5 pacientov s pozitívnym výsledkom zároveň detegovali deléciu chromozómu 6, čo bolo zaujímavým zistením, rovnako ako to, že všetci pacienti patrili do skupiny 1 a 2 (WHO klasifikácia).

Skupinu pacientov pre túto prácu tvorilo 6 pacientov s diagnostikovaným meduloblastómom. Vybraní pacienti spadali do skupiny meduloblastómov I (Wnt skupina) podľa molekulárne - genetického rozdelenia, ktoré v roku 2011 zaviedol Taylor a kol. Táto skupina sa vyznačuje veľmi dobrou prognózou a radí sa sem klasický a desmoplastický meduloblastóm (1. a 2. skupina podľa histopatologického typu nádoru), čo pacienti v tejto vzorke spĺňali. Zaradenie do skupiny Wnt, a tým určenie pre priamu sekvenáciu na dôkaz prítomnosti mutácie *β -katenínu*, bolo vykonané na základe preukázanej delécie chromozómu 6 a neamplifikovaného *MYCN* onkogénu. Potvrdenie týchto dvoch faktorov bolo vykonané pomocou metódy FISH a MLPA. Rozsah sledovaného úseku bol stanovený od exónu 2 po exón 4. Dôvodom bol najčastejší, doposiaľ zistený, výskyt mutácií v exóne 3 v spojitosti s nádorovými ochoreniami (Morin a kol. 1997). Hoci bol, na základe vyššie uvedených faktov (monozómia 6 a neamplifikovaný *MYCN*), predpokladaný výskyt mutácie *β -katenínu* u všetkých vyšetrených vzoriek (6), pozitívny výsledok bol preukázaný v 4 z nich (66,6 %). Podobný výsledok dosiahol Robinson a kol. v roku 2012, kedy osekvenovali 11 pacientov zo skupiny Wnt meduloblastómov a preukázali prítomnosť mutácie *β -katenínu* v 7 prípadoch (72,7 %). V porovnaní s týmito výsledkami a výsledkami Fattet a kol. (2009), ktoré vykázali incidenciu mutácie *β -katenínu* 83,3 % v prípade prítomnosti monozómie 6, bola v rámci diplomovej práce dosiahnutá nižšia hodnota. Dôvodom by mohla byť chyba pri sekvenovaní, ktorú je potrebné overiť opakovaným testovaním dvoch negatívnych vzoriek. V prípade pozitívnych výsledkov bola u jedného pacienta detegovaná mutácia v kodóne 34 a zapríčinila zámenu glycínu za valín (p.G34V) a u dvoch mutácia v kodóne 33, ktorá vedie k substitúcii serínu za fenylalanín (p. S33F). U jedného

pacienta bola zistená prítomnosť mutácií v oboch kodónoch 33 a 37. Tieto výsledky prispeli k úvahám vyššie uvedených štúdií (Zurawell a kol. 1998, Huang a kol. 2000) o kodónoch 33 a 37 ako o hotspotoch pre gén *β-katenín*.

β-katenín sa ako súčasť Wnt signálnej dráhy javí ako sľubný cieľ therapeutickej liečby vybraných nádorových ochorení, vrátane meduloblastómu. Je dôležité určenie špecifickosti jednotlivých skupín tohto tumoru (molekulárne - biologické prognostické faktory) a tým uľahčenie výberu správnej liečby jednotlivých pacientov. *β-katenín*, ktorý sa medzi potenciálne prognostické ukazovatele radí, bol preto predmetom záujmu tejto práce, rovnako ako ostatné 2 gény *BRAF* a *ALK*.

8. Súhrn

- Pomocou molekulárno – genetických metód bolo vyšetrených celkom 133 vzoriek pochádzajúcich od pacientov s diagnostikovaným neuroektodermálnym nádorom s cieľom detekcie somatických mutácií u génov *ALK*, *BRAF* a *β-katenín* (*CTNNB1*).
- Na prítomnosť mutácie V600E génu *BRAF* (exón 15) bolo metódou priamej sekvenácie vyšetrených 23 vzoriek neuroblastómu, 31 vzoriek meduloblastómu a 47 vzoriek feochromocytómu, pričom všetky vykazovali negatívny výsledok a nebol tak potvrdený predpoklad o výskyte mutácie V600E v prípade týchto nádorov. V prípade 29 vzoriek nádorov mozgu: 21 astrocytómov, 4 glioblastómy a 4 gangliogliomy, bola metódou MLPA preukázaná mutácia V600E v prípade 2 vzoriek astrocytómu, čo tvrdenie, vyjadrené v úvode práce, potvrdzuje.
- 7 vybraných pacientov s diagnostikovaným neuroblastómom (štádium 3 a 4) bolo priamou sekvenáciou testovaných na prítomnosť mutácie *ALK* génu, so zameraním na exóny 23 a 25, pričom u jedného pacienta bol predpoklad pozitívneho výsledku potvrdený, a to preukázaním mutácie F114L v exóne 23.
- Zo skupiny vzoriek meduloblastómu bolo vyselektovaných 6, ktoré sa radili do Wnt skupiny (na základe preukázanej monozómie 6), a boli metódou priamej sekvenácie vyšetrené na dôkaz prítomnosti mutácie v géne *β-katenín* so zameraním na exóny 2-4. Pozitívny výsledok bol preukázaný v 4 prípadoch v kodónoch 33, 34 a 37, čím bola potvrdená hypotéza o spoločnom výskyte delécie chromozómu 6 a mutácie *β-katenínu*.
- Práca mala svojimi výsledkami pomôcť k identifikácii študovaných génov a ich mutácií ako prognostických ukazovateľov klasifikácie vybraných typov nádorov a tým prispieť k zavedeniu vhodnejšej liečby, založenej na inhibícii mutovaných génov. Výsledky tejto práce nepreukázali zvýšenú incidenciu *BRAF* mutácie u FEO/PARA, nebudú sa teda môcť využiť *BRAF* inhibítory k liečbe týchto ochorení. Naopak bola preukázaná Wnt aktivácia u pacientov s meduloblastómom, ktorí, podľa predpokladu, prežívajú v dobrom klinickom stave, čo vedie k možnosti zníženia intenzity terapie, predovšetkým obmedzenia rádioterapie u týchto pacientov. *ALK* mutácia sa javí ako veľmi vhodný terapeutický cieľ, ale bude vyžadovať zhodnotenie celoeurópskej štúdie, vzhľadom k nízkej incidencii mutácie.

9. Literatúra

1. Allouche, M. (2010): ALK (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 14: 1059-64.
2. Ambros, P.F., Ambros, M., Brouder, G.M., Haber, M., Khan, J., Nakagawara, A., Schleiermacher, G., Speleman, F., Spitz, R., London, W.B., Cohn, S.L. a kol. (2009): International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Journal of Cancer* 100: 1471-82.
3. Azarova, A.M., Gautam, G., George, R.E (2011): Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Seminars in cancer biology* 21: 267-275.
4. Balmano, K., Cook, S.J. (2009): Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 16: 368-77.
5. Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmeier, W. (1996): Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638-42.
6. Blumer, K. J. and Johnson, C. L (1994): Diversity in function and regulation of MAP kinase pathway. *Trends Biochem. Sci.* 19: 236-240.
7. Braun, B.S., Shannon, K. (2008): Targeting Ras in myeloid leukemias. *Clin Cancer Res.* 14: 2249-52.
8. Brodeur, G.M., Castleberry, R.P. (1997): Neuroblastoma. In: Pizzo, P.A., Poplack, D.G.: *Principles and practice of pediatric oncology*, 3th edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 761-97.
9. Brodeur, G.M., Maris, J.M., Yamashiro, D.J., Hogarty, M.D, White, P.S. (1997): Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol.*19: 93-101.
10. Brouwers, F.M., Eisenhofer, G., Tao, J.J., Kant, J.A., Adams, K.T. Linehan, W.M., Pacak, K. (2006): High frequency of SDHB germline mutations in patients with malignant catecholamine-producing paragangliomas: implications for genetic testing. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4505-9.
11. Burnichon, N., Vescovo, L., Amar, L., Libe, R., de Reynies, A., Venisse, A., Jouanno, E., Laurendeau, I., Parfait, B., Bertherat, J. a kol. (2011): Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Human Molecular Genetics* 20: 3974–85.
12. Clevers, H. (2006): Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469–80.
13. Curia, M.C., Zuckermann, M., De Lellis, L., Catalano, T., Lattanzio, R., Aceto, G., Veschi, S., Cama, A., Otte, J.B., Piantelli, M., Mariani-Costantini, R., Cetta, F., Battista, P. (2008): Sporadic childhood hepatoblastomas show activation of beta-catenin, mismatch repair defects and p53 mutations. *Mod Pathol.* 21: 7-14.
14. Dahiya, S., Yu, J., Kaul, A., Leonard, J.R., Gutmann, D.H. (2012): Novel BRAF Alteration in a Sporadic Pilocytic Astrocytoma. *Case Rep Med* 2012: 1-4.
15. Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., a kol. (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-54.

16. De Brouwer, S., De Preter, K., Kumps, C., Zabrocki, P., Porcu, M., Westerhout, E.M., Lakeman, A., Vandesompele, J., Hoebeek, J., Van Maerken, T. a kol. (2011): Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res.* 16: 4353–62.
17. De Ligt, J., Willemsen, M. H., van Bon, B. W. M., Kleefstra, T., Yntema, H. G., Kroes, T., Vulto-van Silfhout, A. T., Koolen, D. A., de Vries, P., Gilissen, C. a kol. (2012): Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *New Eng. J. Med.* 367: 1921-9.
18. Dougherty MJ, Santi M, Brose MS, Ma, C., Resnick, A.C., Sievert, A.J., Storm, P.B., Biegel, J.A. (2010): Activating mutations in *BRAF* characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro. Oncol.* 12: 621–30.
19. Dreyfuss, J.M., Johnson, M.D., Park, P.J. (2009): Meta-analysis of glioblastoma multiforme versus anaplastic astrocytoma identifies robust gene markers. *Mol Cancer* 8: 71.
20. Eychene, A., Barnier, J. V., Apiou, F., Dutrillaux, B., Calothy, G. (1992): Chromosomal assignment of two human B-raf(Rml) proto-oncogene loci: B-raf-1 encoding the p94(Braf/Rml) and B-raf-2, a processed pseudogene. *Oncogene* 7: 1657-60.
21. Fattet, S., Haberler, C., Legoix, P., Varlet, P., Lellouch-Tubiana, A., Lair, S., Manie, E., Raquin, M.A., Bours, D., Carpentier, S. a kol. (2009): Beta-catenin status in paediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. *J Pathol* 218: 86-94.
22. George, R.E., Sanda, T., Hanna, M., Fröhling, S., Luther, W., Zhang, J., Ahn, Y., Zhou, W., London, W.B. a kol. (2008): Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 455: 975-8.
23. Grande, E., Bolós, M.V. and Arriola, E. (2011): Targeting Oncogenic ALK: A promising Strategy for Cancer Treatment *Mol Cancer Ther* 10: 569-79.
24. Greengard, E.G., Park, J.R. (2010): ALK-Related Neuroblastic Tumor Susceptibility. In: Pagon, R.A., Adam, M.P., Ardinger, H.H. a kol. (eds): *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle; Seattle (WA), 1993-2015.
25. He, X., Semenov, M., Tamai, K., Zeng, X. (2004): LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131: 1663–77.
26. Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.P., Nickerson, E., Auclair, D., Liren, L.I. a kol. (2012): A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* 150: 251-63.
27. Huang, H., Mahler-Araujo, B.M., Sankila, A., Chimelli, L., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. (2000): APC Mutations in Sporadic Medulloblastomas. *The American Journal of Pathology* 156: 433-7.
28. Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., Chakraborti, T. (2003): Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253: 269–85.
29. Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M. (2011): Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *The New England journal of medicine* 364: 2507-16.
30. Chappell, W.H., Steelman, L.S., Long, J.M., Kempf, R.C., Abrams, S.L, Franklin, R.A., Bäsecke, J., Stivala, F., Donia, M., Fagone, P., a kol. (2011): Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Inhibitors: Rationale and Importance to Inhibiting These Pathways in Human Health. *Oncotarget* 2: 135-64.

31. Chen, B., Dodge, M.E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C.W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N.S., a kol. (2009): Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nature chemical biology* 5: 100–107.
32. Chen, Y., Takita, J., Choi, Y. L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., Wang, L., Soda, M., Kikuchi, A., Igarashi, T., Nakagawara, A., Hayashi, Y., Mano, H., Ogawa, S. (2008): Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455: 971-974.
33. Cheung, N.K.V., Zhang, J., Lu, CH., Parker, M., Bahrami, A., Tickoo, S.K., Heguy, A., Pappo, A.S., Federico, S., Dalton, J. a kol. (2012): Association of Age at Diagnosis and Genetic Mutations inPatients with Neuroblastoma. *JAMA* 307: 1062-71.
34. Chung, E., Kondo, M. (2011): Role of Ras/Raf/MEK/ERK signaling in physiological hematopoiesis and leukemia development. *Immunol Res.* 49: 248-68.
35. Churácková, M. (2008): Nádory centrálního nervového systému u dětí a mladistvých. *Onkologie* 2: 234–38.
36. Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugieres, L., Ribeiro, A., de Pontual, L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., Valteau-Couanet, D., Frebourg, T., Michon, J., Lyonnet, S., Amiel, J., Delattre, O. (2008): Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455: 967-970.
37. Janoueix-Lerosey, I., Lequine, D., Brugières, L., Ribeiro,A., de Pontual, A.L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., a kol. (2008): Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455: 967-70.
38. Jochmanová, I.,Zelinka, T. , Widimský J., Pacak, K. (2014): HIF Signaling Pathway in Pheochromocytoma and Other Neuroendocrine Tumors. *Physiol. Res.* 63: 251-62.
39. Jones, D. T. W., Kocialkowski, S., Liu, L., Pearson, D. M., Ichimura, K., Collins, V. P. (2009): Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene* 28: 2119-23.
40. KARASEK, D., SHAH, U., FRYSAK, Z., STRATAKIS, C.A., PACAK, K. (2012): An update on the genetics of phaeochromocytoma. *J Hum Hypertens* 27: 141-47.
41. Kleihues, P., Cavenee, W.K. (2007): Pathology and genetics of tumors of the nervous system. Press, Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC).
42. Kleinschmidt, L. (2006) Principles of Cancer Biology. Benjamin Cummings, San Francisco.
43. Knight, T., Irving, J.A.E. (2014): Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. *Frontiers in Oncology* 4: 160.
44. Koesters, R., Hans, M.A., Benner, A., Prosst, R., Boehm, J., Gahlen, J., Doeberitz, M.V.K. (2001): Predominant mutation of codon 41 of the β -catenin proto-oncogene in rat colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine using a complete carcinogenic protocol. *Carcinogenesis* 22: 1885-90.
45. Koch, A., Denkhaus, D., Albrecht, S., Leuschner, I., von Schweinitz, D., Pietsch, T. (1999): Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the β -catenin gene. *Cancer Res.* 59: 269-73.
46. Lee, C.C., Jia, Y., Li, N., Sun, X., Ng, K., Ambing, E., Gao, M.Y., Hua, S., Chen, C., Kim, S., Michellys, P.Y., Lesley, S.A., Harris, J.L., Spraggon, G. (2010): Crystal structure of the ALK (anaplastic lymphoma kinase) catalytic domain. *Biochem J.* 430: 425-37.

47. Legoix, P., Bluteau, O., Bayer, J., Perret, C., Balabaud, C., Belghiti, J., Franco, D., Thomas, G., Laurent-Puig, P. Zucman-Rossi, J. (1999): Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. *Oncogene* 18: 4044-6.
48. Lepourcelet, M., Chen, Y.N., France, D.S., Wang, H., Crews, P., Petersen, F., Bruseo, C., Wood, A.W., Shivdasani, R.A. (2004): Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* 5: 91–102.
49. Liu, Z., Thiele, C.J. (2012): ALK and MYCN: when two oncogenes are better than one. *Cancer Cell* 21: 325-326.
50. Logan, C.Y., Nusse, R. (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20: 781–810.
51. Louis, D.N., Holland, E.C., Cairncross, J.G.(2001): Glioma Classification. *The American Journal of Pathology* 159: 779-786.
52. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P. (2007): WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* 114: 97-109.
53. MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X. (2009): Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* 17: 9-26.
54. Major, M.B., Camp, N.D., Berndt, J.D., Yi, X., Goldenberg, S.J., Hubbert, C., Biechele, T.L., Gingras, A.C., Zheng, N., Maccoss, M.J., Angers, S., Moon, R.T. (2007): Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* 316: 1043-6.
55. Maldonado, J.L., Fridlyand, J., Patel, H., Jain, A.N., Busam, K., Kageshita, T., Ono, T., Albertson, D.G. Pinkel, D., Bastian, B.C. (2003): Determinants of BRAF Mutations in Primary Melanomas. *J Natl Cancer Inst* 95: 1878-90.
56. Martinsson, T., Eriksson, T., Abrahamsson, J., Caren, H., Hansson, M., Kogner, P., Kamaraj, S., Schönherr, C., Weinmar, J., Ruuth, K., Palmer, R.H., Hallberg, B. (2011): Appearance of the novel activating F1174S ALK mutation in neuroblastoma correlates with aggressive tumor progression and unresponsiveness to therapy. *Cancer Res.* 71: 98-105.
57. Molenaar, J.J., Koster, J., Zwijnenburg, D.A., van Suis, P., Valentijn, L.J, van der Ploeg, I., Hamdi, M., van Nes, J., Westerman, B.A., van Arkel, J. a kol. (2012): Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* 483: 589-93.
58. Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275: 1787-90.
59. Murali, J., Bénard, A., Lourenço, F.C., Monnet, C., Greenland, C., Moog-Lutz, C., Racaud-Sultan, C., Gonzalez-Dunia, D., Vigny, M., Mehlen, P., Delsol, G., Allouche, M. (2006): Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 26: 6209-22.
60. Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., Polakis, P. (1995): Regulation of intracellular β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3046-50.
61. Myung, J. K., Cho, H., Park, C.K., Kim, S.K., Lee, S.H., Park, S.H. (2012): Analysis of the BRAFV600E Mutation in Central Nervous System Tumors. *Translational Oncology* 5: 430–436.

62. Namba, H., Nakashima, M., Hayashi, T., Hayashida, N., Maeda, S., Rogounovitch, T. I., Ohtsuru, A., Saenko, V. A., Kanematsu, T., Yamashita, S. (2003): Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J. Clin. Endocr. Metab.* 88: 4393-97.
63. Naoki, K., Chen, T.H., Richards, W.G., Sugarbaker, D.J., Meyerson, M. (2002): Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 62: 7001-3.
64. Neumann, H.P.H., Bausch, B., McWhinney, S.R., Bender, B.U., Gimm, O., Frankre, G., Schipper, J., Klisch, J., Althoefer, C., Zerres, K. (2002): Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *New Engl J Med* 346: 1459-66.
65. Nevšimalová, S., Růžicka, E., Tichý, J. (2002): *Neurologie*. 1.vyd. Galén, Praha.
66. Nussbaum, R.L., Mcinnes, R.R., Willard, H.F., Thompson, J., Thompson, M.W. (2004): *Klinická genetika: Thompson & Thompson* : 6. Vyd, Vyd. 1. Triton, Praha.
67. Opocher, G.; Schiavi, F. (2011): Functional consequences of succinate dehydrogenase mutations. *Endocr Pract* 3: 64-71.
68. Palmer, R.H., Vernersson, E., Grabbe, C., Hallberg, B. (2009): Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J.* 420: 345–61.
69. Peifer, M. (1993): Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection. *Science* 262: 1667-8.
70. Pfister, S., Janzarik, W. G., Remke, M., Ernst, A., Werft, W., Becker, N., Toedt, G., Wittmann, A., Kratz, C., Olbrich, H., Ahmadi, R., Thieme, B., a kol. (2008): BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK activation in low-grade astrocytomas. *J. Clin. Invest.* 118: 1739-49.
71. Pfister, S., Remke, M., Benner, A., Mendorzyk, F., Toedt, G., Felsberg, J., Wittmann, A., Devens, F., Gerber, N.U., Joos, S. a kol. (2009): Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci. *J Clin Oncol.* 27: 1627–36.
72. Poulikakos, P. I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K. M., Rosen, N. (2010): RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464: 427-30.
73. Prahallad, A., Sun, C., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Salazar, R., Zecchin, D., Beijersbergen, R. L., Bardelli, A., Bernards, R. (2012): Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483: 100-103.
74. Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Velculescu, V.E. (2002): Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418: 934.
75. Ries, L.A.G., Smith, M.A., Gurney, J.G., Linet, M., Tamra, T., Young, J.L., Bunin, G.R. (eds) (1999): *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD.
76. Roberts, P.J., Der, C.J. (2007): Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291-3310.
77. Robinson, G., Parker, M., Kranenburg, T.A., Lu, Ch., Chen, X., Ding, L., Phoenix, T.N., Hedlund, E., Wei, L., Zhu, X. a kol. (2012): Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature* 488: 43–48.
78. Rodríguez-Viciana, P., Tetsu, O., Tidyman, W.E., Estep, A.L., Conger, B.A., Santa Cruz, M., McCormick, F., Rauen, K.A. (2006): Germline Mutations in Genes Within the MAPK Pathway Cause Cardio-facio-cutaneous Syndrome. *Science* 311: 1287-90.

79. Roskoski, R. (2013): Anaplastic lymphoma kinase (ALK): Structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacological Research* 68: 68-94.
80. Rubinstein, J.C., Sznol, M., Pavlick, A.C., Ariyan, S., Cheng, E., Bacchiocchi, A., Kluger, H.M., Narayan, D., Halaban, R. (2010): Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *Journal of Translational Medicine* 8: 67.
81. Sarkozy, A., Carta, C., Moretti, S., Zampino, G., Digilio, M. C., Pantaleoni, F., Scioletti, A. P., Esposito, G., Cordeddu, V., Lepri, F., Petrangeli, V., Dentici, M. L., a kol. (2009): Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum. Mutat.* 30: 695-702.
82. Shukla, N., Ameer, N., Yilmaz, I., Nafa, K., Lau, Ch.Y., Marchetti, A., Borsu, L., Barr, F.G., Ladanyi, M. (2012): Oncogene Mutation Profiling of Pediatric Solid Tumors Reveals Significant Subsets of Embryonal Rhabdomyosarcoma and Neuroblastoma with Mutated Genes in Growth Signaling Pathways. *Clin Cancer* 18: 748-57.
83. Schindler, G., Capper, D., Meyer, J., Janzarik, W., Omran, H., Herold-Mende, Ch., Schmieder, K., Wesseling, P., Mawrin, Ch. a kol. (2011): Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 121: 397–405.
84. Sithanandam, G., Kolch, W., Duh, F.M., Rapp, U.R. (1990): Complete coding sequence of human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies. *Oncogenes* 5:1775-80.
85. Smith, M.A., Altekruse, S.F., Adamson, P.C., Reaman, G.H., Seibel, N.L. (2014): Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer* 120: 2497-506.
86. Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y., Mano, H. (2007): Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448: 561–6.
87. Solit, D. B., Garraway, L. A., Pratilas, C. A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J. M., She, Y., Osman, I., Golub, T. R., Sebolt-Leopold, J., Sellers, W. R., Rosen, N. (2006): BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 439: 358-62.
88. Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1998): Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 1130-4.
89. Stephens, O.F., Aigner, K.R. (2009): Basic of oncology. Springer, New York.
90. Stoica, G.E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D.J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A.T., Wellstein, A. (2001): Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem* 276: 16772-9.
91. Stoica, G.E., Kuo, A., Powers, C., Bowden, E.T., Sale, E.B., Riegel, A.T., Wellstein, A. (2002): Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem* 277: 35990-8.
92. Taylor, M.D., Northcott, P.A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y.J., Clifford, S.C., Eberhart, CH.G., Parsons, D.W., Rutkowski, S. a kol.(2011): Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathologica* 123: 465-72.
93. Tol, J., Nagtegaal, I. D., Punt, C. J. A. (2009): BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. (Letter) *New Eng. J. Med.* 361: 98-9.

94. Udatsu, Y., Kusafuka, T., Kuroda, S., Miao, J., Okada, A. (2001): High frequency of β -catenin mutations in hepatoblastoma. *Pediatr. Surg. Int.* 17: 508-12.
95. Venesio, T., Balsamo, A., Errichiello, E., Ranzani, G.N., Risio, M. (2013): Oxidative DNA damage drives carcinogenesis in MUTYH-associated-polyposis by specific mutations of mitochondrial and MAPK genes. *Modern Pathology* 26: 1371-1381.
96. Vetter, I.R., Wittinghofer, A. (2001): The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294: 1299-304.
97. Vícha, A., Musil, Z., Pacak K. (2013): Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma syndromes: new advances and future treatment options. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* 20: 186-191.
98. Vícha, A.; Eckschlager T. (2008): Využití MLPA techniky k průkazu genetických změn u neuroblastomu. *Klinická onkologie* 21: 149-53.
99. Wan, P.T.C, Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Cancer Genome Project, Jones, C.M., Marshall, C.H.J., a kol. (2004): Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* 116: 855-67.
100. Welander, J., Larsson, C., Backdahl, M., Hareni, N., Sivler, T., Brauckhoff, M., Soderkvist, P., Gimm, O. (2012): Integrative genomics reveals frequent somatic NF1 mutations in sporadic pheochromocytomas. *Human Molecular Genetics* 21: 5406–16.
101. Wood, A.C., Laudenslager, M., Haglund, E.A., Attiyeh, E.F., Pawel, B., Courtright, J., Plegaria, J., Christensen, J.G., Maris, J.M., Mosse, Y.P. (2009): Inhibition of ALK mutated neuroblastomas by the selective inhibitor PF-02341066. *J Clin Oncol* 27: 15.
102. Yu, J., Deshmukh, H., Gutmann, R. J., Emnett, R. J., Rodriguez, F. J., Watson, M. A., Nagarajan, R., Gutmann, D. H. (2009): Alterations of BRAF and HIPK2 loci predominate in sporadic pilocytic astrocytoma. *Neurology* 73: 1526-31.
103. Zelinka, T., Eisenhofer, G., Pacák, K. (2007): Pheochromocytoma as a catecholamine producing tumor: Implications for clinical practice. *Stress* 10: 195–203.
104. Zhang, Y., Appleton, B.A., Wiesmann, C., Lau, T., Costa, M., Hannoush, R.N., Sidhu, S.S. (2009): Inhibition of Wnt signaling by Dishevelled PDZ peptides. *Nature chemical biology* 5:217–19.
105. Zitterbart, K., Pavelka, Z., Zitterbartová, J. (2010): Meduloblastom: nejčastější zhoubný nádor mozku u dětí. *Onkologie* 4: 256–9.
106. Zou, H.Y., Li, Q., Lee, J.H., Arango, M.E., McDonnell, S.R., Yamazaki, S., Koudriakova, T.B., Alton, G., Ciu, J.J., Kung, P.P. a kol. (2007): An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* 67: 4408.
107. Zurawel, R.H., Chiappa, S.A., Allen, C., Raffel, C. (1998): Sporadic medulloblastomas contain oncogenic β -catenin mutations. *Cancer Res* 58: 896-9.