

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie

Specializace: Molekulární biologie a genetika eukaryot



Bc. Kristýna Šediváková

Molekulárně cytogenetická analýza gliálních buněk a její přínos pro klasifikaci mozkových nádorů.

Molecular cytogenetic analysis of glial cells and its contribution to the classification of brain tumors.

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Praha 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze dne

Kristýna Šediváková

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především školitelce mé práce doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc., za věnovaný čas, cenné rady a připomínky. V neposlední řadě děkuji příteli, rodině a nejbližším přátelům za nekonečnou podporu v průběhu studia.

Abstrakt

Difúzní gliomy jsou heterogenní skupina mozkových nádorů, které se liší odezvou na léčbu a prognózou. Nejpočetněji jsou zastoupeny nádory derivující z astrocytárních a oligodendroglálních buněk. Histologická klasifikace gliomů je často subjektivní a rovněž jejich léčba je dnes stále problematická.

Cílem práce bylo provést detailní molekulárně cytogenetickou analýzu genomu nádorových buněk u nemocných s histologicky potvrzenými mozkovými gliomy různých subtypů a stupňů malignity, hledat rekurentní aberace specifické pro jednotlivé subtypy a posoudit jejich potenciální úlohu při vzniku a progresi nádoru. Ke sledování frekvence známých specifických aberací v různých subtypech mozkových nádorů jsme použili metodu interfázní FISH (I-FISH) s panelem lokus specifických a/nebo centromerických DNA sond. K celogenomové analýze a k detekci kryptických nebalancovaných změn v genomu nádorových buněk jsme použili metodu SNP array.

Kombinací metod I- FISH a SNP array jsme detekovali nejen známé chromosomové změny, které jsou typické pro jednotlivé subtypy nádorů, ale také nové nebo méně časté rekurentní aberace. U nemocných s nízkostupňovými gliomy jsme nejčastěji pozorovali získanou UPD (aUPD) na krátkých ramenech chromosomu 17. Zajímavý byl rovněž nález mnohočetné fragmentace dlouhých ramen chromosomu 10 u jednoho pacienta s anaplastickým astrocytmem. (tzv. chromothripsis). Na základě výsledků molekulárně cytogenetických analýz jsme vytypovali několik genů, které by mohly být významné pro vznik a/nebo progresi gliomů. Jsou to například geny *NUCKS1*, *GRB10*, *AURKB* a *HIC1*.

Podrobná analýza nejčastěji postižených oblastí v genomu nádorových buněk a identifikace kandidátních genů v těchto oblastech lokalizovaných může pomoci k objasnění kroků vedoucích k malignímu zvratu buňky a v budoucnu by mohla přispět i k vývoji nových cílených léčebných přístupů. Přesný význam zjištěných aberací však ještě bude nezbytné ověřit v dalších studiích na větších souborech nemocných.

Klíčová slova: Mozkové gliomy, genomové změny, chromosomové aberace, nízkostupňové gliomy, vysokostupňové gliomy, I-FISH, mikročipové technologie

Abstract

Brain gliomas represent a heterogeneous group of tumors of various histological subtypes which differ according to their response to treatment and prognosis. Tumors created from astrocytes and oligodendrocytes occur most often. Histological classification of gliomas is often subjective, as well as their treatment today is still problematic.

The aim of this diploma thesis was to carry out a detailed molecular cytogenetic analysis of the genome of tumor cells in patients with histologically confirmed brain gliomas of different subtypes and stages of malignancy, look for recurrent aberration-specific subtypes and assess their potential role in the development and progression of cancer. To observation specific frequency known aberrations in different subtypes of brain tumors, we used the method of interphase FISH (I-FISH) with a panel of specific locus and / or centromeric DNA probes. The whole genome analysis and detection of cryptic unbalanced changes in the genome of tumor cells, we used the method of SNP array.

Combining methods I- FISH and SNP array was detected not only the known chromosomal changes that are typical of the different subtypes of tumors, but also new or uncommon recurrent aberrations. In patients with low-grade gliomas are the most commonly observed acquired UPD (aUPD) on the short arms of chromosome 17. Interesting finding was also a multiple fragmentation of the long arm of chromosome 10 by one patient with anaplastic astrocytoma. (ie. chromothripsis).

On the based of the results of molecular cytogenetic analysis, we have identified several genes that might be important for the formation and / or progression of gliomas. These include genes *NUCKS1*, *GRB10*, *AURKB* and *HIC1*.

A detailed analysis of the most affected areas in the genome of tumor cells and identification of candidate genes located in these areas may help to explain the steps leading to malignant transformation cells and in the future could contribute to the development of new targeted therapeutic approaches. The exact magnitude of the aberrations will still be necessary to verify in future studies on a larger number of patients.

Keywords: Brain glioma, genomic aberrations, chromosomal aberrations, low-grade gliomas, high-grade gliomas, I-FISH, microarray technology

Seznam zkratek

aUPD	Acquired uniparental disomy	Získaná uniparentální disomie
<i>AURKB</i>	Aurora kinase B	Gen kódující Aurora B kinázu
<i>AXA 7</i>	Annexin A7	Tumor supresorový gen AXA7
<i>CARD9</i>	Caspase recruitment domain family, member 9	Gen kódující Notch 1
<i>CCL2</i>	Chemokine C-C motiv ligand 2	Gen kódující chemokine C-C motiv ligand 2
<i>CCNE1</i>	Cyclin E1	Gen kódující cyklin E
<i>CDK4/6-cyklin D</i>	Cyclin dependent kinase 4, Cyclin dependent kinase 6, cyklin D	Komplex cyklin dependetních kináz 4/6, cyklin D
<i>CDK6</i>	Cyclin-dependent kinase 6	Gen kódující cyklin dependetní kinázu 6
<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Gen kódující inhibitor cyklin dependentní kinázy 2A
<i>DMRTA1</i>	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1	Gen kódující transkripční faktor DMRTA1
<i>DOCK8</i>	Dedicator of cytokinesis 8	Gen kódující DOCK8
E2F	E2F transcription factor	E2F transkripční faktor
<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor	Gen kódující receptor pro epidermální růstový faktor
<i>ELK4</i>	SRF accessory protein 1	Gen kódující protein SRF
EORTC	European Organisation for Reserch and Treatment of Cancer	Evropská organizace pro výzkum a léčbu rakoviny
<i>FGF21</i>	Fibroblast growth factor 21	Gen kódující receptor fibroblastů
gDNA	Genome DNA	Genomová DNA
<i>GRB10</i>	Growth factor receptor-bound protein 10	Gen kódující receptor růstového faktoru vázajícího protein 10
<i>HIC1</i>	Hypermethylated in cancer 1	Gen kódující protein HIC1
<i>IDH</i>	Isocitrate dehydrogenase	Geny kódující Izocitrát dehydrogenázu
<i>I-FISH</i>	Interphase Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	Interfázní fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<i>IFNE</i>	Interferon, epsilon	Gen kódující interferon epsilon
<i>IKZF1</i>	Ikaros family zinc finger 1	Gen kódující protein Ikaros z rodiny proteinů zinkového prstu
<i>IL 10, 19, 20, 24</i>	Interleukin 10, 19, 20, 24	Geny kódující interleukin 10, 19, 20, 24
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature	Mezinárodní cytogenetická nomenklatura
<i>KLF5</i>	Kruppel-like factor 5	Gen kódující Kruppel-like faktor 5
<i>MAD1L1</i>	MAD1 mitotic arrest deficient-like 1	
<i>MDM2</i>	Mouse double minute 2 human homolog	Mouse double minute 2 human homolog
MEK1	Mitogen-activated protein kinase kinase	Enzym fosorylující mitogenem aktivovanou proteinkinázu (MAP)
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	Receptor pro protoonkogen MET

MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	Gen kódující růstový faktor hepatocytů
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
<i>NF1</i>	Neurofibromin 1	Gen kódující Neurofibromin 1
<i>NOTCH1</i>	Notch 1	Gen kódující doublesex and mab-3 related transkripční faktor
<i>NR5A2</i>	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	Gen kódující jaderný receptor rodiny A
<i>NUCKS1</i>	Nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1	Gen kódující jadernou casein kinázu a substrát 1 cyklin dependetních kináz
p14 ^{ARF}	ARF tumor supressor	Tumor supresorový protein p14ARF
<i>PAX5</i>	Paired box 5	Gen kódující paired box 5
<i>PDGFRA</i>	Platelet-derived grow factor receptor A	Gen kódující receptor pro růstový faktor PDGF
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	Phosphatidylinositol-3-kinázy
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate	Fosfatidylinositol (3,4,5)-trifosfát
<i>POLR2A</i>	Polymerase II polypeptide A	Gen kódující polymerázu II polypeptid A
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog	Fosfatáza a tenzin homolog
<i>RAB29</i>	RAS oncogene family	Gen z rodiny RAS onkogneů
Raf1	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	Serin/threonin kinázu Raf1
<i>RASSF5</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5/ NORE1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5/ NORE1
<i>RB1</i>	Retinoblastoma protein	Gen kódující retinoblastomový protein
<i>RPL18</i>	Ribosomal protein L18	Gen kódující ribosomální protein L18
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group	odborná společnost pro radioterapii v onkologii
<i>SLC45A3</i>	Solute carrier family 45	Gen kódující solute carrier family 45
SNP array	Single Nucleotide Polymorfism array	Mikročipová technologie založená na analýze jednonukleotidových polymorfismů
<i>STK11</i>	Serine/threonine kinase 11	Gen kódující serin/threonin kinázu 11
TCF3	Transcription factor 3	Gen kódující transkripční faktor 3
<i>TNFSF13</i>	Tumor necrosis factor super family, member 13	Gen kódující protein z rodiny nekrotických faktorů
<i>TP53</i>	Tumor protein p53	Tumor supresorový gen kódují nádorový protein p53
<i>TRG</i>	T- cell receptor gamma locus	Gen kódující T buněčný receptor gamma
UPD	Uniparental disomy	Uniparentální disomie
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace

Obsah

1. Úvod	11
2. Literární přehled	13
2.1 Dělení mozkových nádorů dle stupně malignity	15
2.1.1 Low-grade gliomy	15
2.1.2 High grade gliomy	16
2.2 Dělení mozkových nádorů dle tkáňového původu	17
2.2.1 Astrocytární nádory	17
2.2.2 Oligodendrogliální nádory	18
2.2.3 Smíšené oligoastrocytární nádory	18
2.3 Chromosomové aberace	20
2.3.1 Strukturní chromosomové aberace	20
2.3.2 Numerické chromosomové aberace – aneuploidie	25
2.3.3 Epigenetické modifikace	25
3 Cíle práce	27
4 Materiál	28
4.1 Chemikálie a roztoky používané pro přípravu buněčných suspenzí	28
4.2 Chemikálie a roztoky používané pro I-FISH	28
4.3 Chemikálie a roztoky používané pro izolaci DNA z periferní krve a mozkové tkáně	29
4.4 Chemikálie a roztoky používané pro SNP array	29
4.5 Programy a databáze	30
5. Metody	31
5.1 Sběr materiálu, informovaný souhlas pacientů, klinicko-patologická data	31
5.2 Zpracování vzorků mozkových nádorů a periferní krve	31
5.2.1 Odběr a zpracování TK vzorků	31
5.2.2 Odběr a zpracování vzorků periferní krve	32
5.3 Interfázni fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (I-FISH)	32
5.3.1 Příprava preparátů pro I-FISH	32
5.3.2 Přehled použitých DNA sond	33
5.3.3 Příprava preparátů pro I-FISH	37
5.3.4 Příprava sond a aplikace DNA sond	37
5.3.5 Mytí preparátů po hybridizaci	38
5.3.6 Analýza ve fluorescenčním mikroskopu	39
5.4 Izolace DNA z mozkové tkáně	39

5.5 Izolace DNA z periferní krve	40
5.6 Kontrola koncentrace a kvality DNA	41
5.6.1 Měření spektrofotometrem	41
5.6.2 Gelová elektroforéza	42
5.7 Metoda SNP array	43
6 Výsledky.....	48
6.1 Výsledky I-FISH	49
6.1.1 Skupina I (nizkostupňové gliomy)	49
6.1.2 Skupina II (vysokostupňové gliomy)	51
6.1.3 Výsledky I-FISH analýzy u kontrolní skupiny.....	54
6.2 Výsledky SNP array	55
6.2.1 Skupina 1 (nizkostupňové gliomy).....	55
6.2.2 Skupina 2 (vysokostupňové gliomy).....	57
6.3 Opakované odběry.....	61
6.4 Analýza rozsahu a typu nebalancovaných změn na chromosomech detekovaných metodou SNP array.....	63
6.4.1 Chromosom 1	64
6.4.2 Chromosom 7	65
6.4.3 Chromosom 9	67
6.4.4 Chromosom 10	68
6.4.5 Chromosom 17	69
6.4.6 Chromosom 19	71
7 Diskuze.....	73
8 Souhrn	82
9 Seznam použité literatury	84

1. Úvod

Mozkové gliomy patří mezi nejčastější nádory centrální nervové soustavy. Jedná se o heterogenní skupinu nádorů odvozených z gliové tkáně. Jsou děleny do několika histologických subtypů, které se od sebe liší prognózou onemocnění, odpovědí na chemoterapeutickou léčbu i změnami v genomu nádorových buněk.

K nejčastějším mozkovým gliomům patří astrocytární nádory odvozené z buněk astrogliální řady, tzv. astrocytomy. Do této skupiny patří tumory různých stupňů malignity (stupeň I až IV), přičemž nejagresivnější je glioblastom stupně IV, který je zároveň nejmorbidnějším mozkovým nádorem.

K dalším subtypům patří oligodendrogliální tumory – tzv. oligodendrogliomy - vycházející z buněk oligodendrocytů a můžeme se rovněž setkat se smíšenými nádory, tzv. oligoastrocytomy, které nesou rysy charakteristické pro oba předchozí subtypy.

Nízkostupňové gliomy jsou charakterizovány vysokým rizikem progresu do nádorů vyšších stupňů, která bývá často provázána změnami v genomu nádorových buněk. Proto je přesná analýza genetických změn u těchto tumorů důležitá a může přispět k odhalení chromosomových aberací, které mají významnou roli ve vývoji a progresi gliomu.

Histologická klasifikace mozkových gliomů založená na jaderné a buněčné morfologii je často velice subjektivní a jednotlivé subtypy nelze odlišit ani pomocí specifických imunohistochemických markerů. Proto se v posledních letech hledají další diagnostické a prognostické ukazatele, které by umožnily přesněji určit o jaký subtyp a stupeň malignity gliomu se jedná.

Jednou z možností je i vyšetření genomu nádorových buněk s využitím molekulárně cytogenetických metod, které přispívají k cílení detekci známých chromosomových aberací charakteristických pro daný subtyp či stupeň malignity a které tak mohou upřesnit histologickou diagnózu. Vyšetření na celogenomové úrovni pak dává komplexní pohled na všechny změny karyotypu u nemocného a umožňují detekovat i kryptické změny v počtu DNA sekvencí. Studium nových rekurentních změn může odhalit nové významné oblasti v genomu nádorových buněk, případně určit nové kandidátní geny, které by mohly souviset s

maligním zvratem buňky. Výsledky molekulárně cytogenetických studií tak přispívají nejen k lepšímu pochopení patogeneze nádoru, ale v budoucnu by mohly přispět i k identifikaci nových cílů pro cílenou protinádorovou léčbu.

2. Literární přehled

Mozkové nádory jsou nejčastější nádory centrální nervové soustavy. V současné době je na území České republiky zaznamenáno okolo 8 nových případů maligních nádorů mozku na 100 000 obyvatel ročně. Nejvíce zhoubných mozkových nádorů je mapováno u pacientů mezi 54-74 rokem (Dušek *et al.* 2005).

Mozkové gliomy jsou tumory, odvozené z gliových buněk a představují téměř 80% primárních mozkových nádorů (Schwartzbaum *et al.* 2006). Zahrnují celou řadu histologických subtypů různých stupňů malignity. V současné době je diagnostika založena na histopatologické analýze morfologie nádorových buněk. O charakteru nádoru dostáváme určitou představu také vyšetřením magnetickou rezonancí s kontrastní látkou a magnetickou rezonanční spektroskopií, které dokážou určit, o jaký stupeň malignity se jedná (Bulik *et al.* 2013).

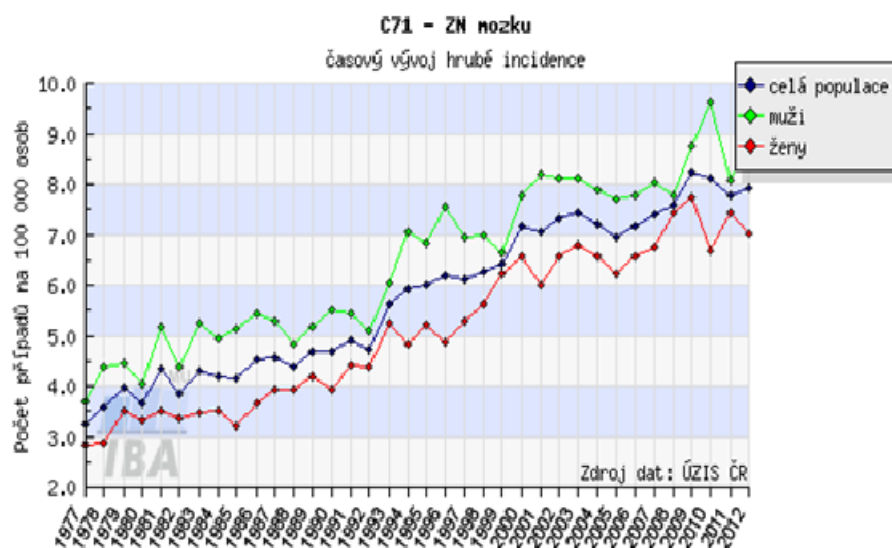
Podle mezinárodní WHO (World Health Organization) klasifikace jsou mozkové gliomy rozděleny dle stupně malignity (tzv. grading) na low-grade (nízkostupňové) a high-grade (vysokostupňové) (Louis *et al.* 2007). K hlavním subtypům patří astrocytomy, oligodendrogliomy a smíšené oligoastocytomy. Určení tkáňového původu a stupně malignity slouží lékařům k indikaci vhodné léčby. Další kritéria zahrnují věk pacienta, neurologický status, lokalizaci a velikost nádoru, rozsah a výsledek chirurgické resekce, proliferální aktivitu a genetické změny. Hlavním cílem terapie je především zkvalitnit a prodloužit délku života (Fadrus *et al.* 2010).

Genetické změny jsou často spojeny se specifickým typem nádoru, a proto mohou sloužit k upřesnění diagnózy. Nejčastěji se jedná o delece, amplifikace, nebalancované translokace, mutace tumor supresorových genů, onkogenů či epigenetické modifikace, zejména metylace. Tyto změny vedou v nádorové buňce k aberantnímu buněčnému růstu a inhibici apoptózy. Identifikace dalších kandidátních změn může vést k lepšímu pochopení mechanismů vedoucích ke vzniku a progresi nádorů (Arslantas *et al.* 2007). V odborných studiích byly genetické změny pozorovány ve většině zkoumaných vzorků nádorové tkáně a bylo dokázáno, že zvyšující se počet genetických změn koreluje s agresivitou nádoru (Zemanová *et al.* 2006)

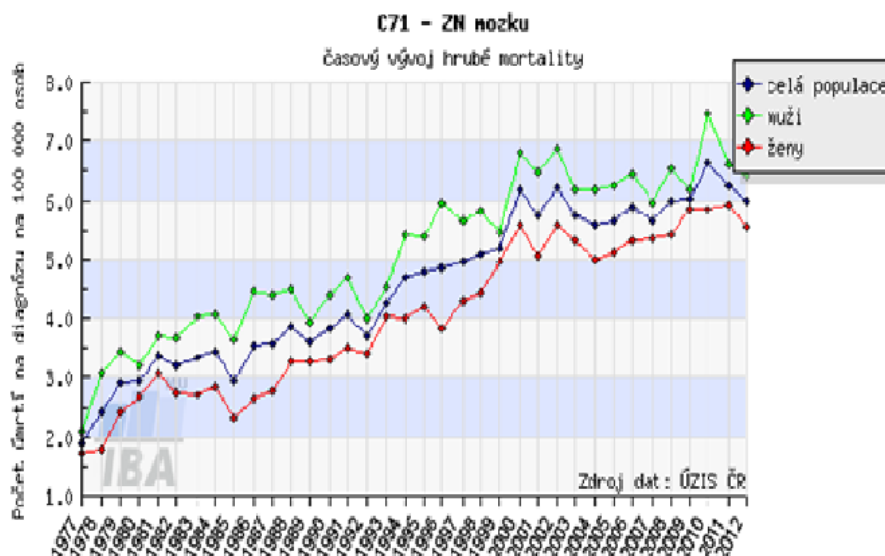
Terapie mozkových gliomů využívá několika léčebných přístupů, jejichž vhodná kombinace umožňuje co nejlépe optimalizovat cílový výsledek. Strategie léčby závisí na biologickém charakteru nádoru, jeho lokalizaci a velikosti a také na celkovém stavu pacienta. Mezi základní možnosti léčby pak patří chirurgická resekce, radioterapie a chemoterapie. (Fadrus *et al.* 2010).

Moderní neurochirurgická léčba mozkových nádorů je komplikována difúzním charakterem růstu nádorových buněk a absencí anatomického rozhraní mezi nádorem a okolní mozkovou tkání. Chemoterapeutická léčba by teoreticky měla být optimálním způsobem léčby maligních gliomů, jejíž buňky mají infiltrativní charakter růstu a jsou rozesety daleko od původního nádorového ložiska. Účinnost terapie je však u mozkových gliomů komplikována omezeným prostupem cytostatik přes hematoencefalitickou bariéru, která často zabraňuje prostupu optimálního množství cytostatika a nedochází tak k dosažení dostatečné koncentrace v nádorové tkáni (Fadrus *et al.* 2010).

V dnešní době je proto hlavním cílem výzkumu pátrání po nových molekulárních změnách, které by zvyšovaly účinnost chemoterapie nebo biologické léčby. Prozatím byly nalezeny dva molekulární markery, jejichž výskyt koreluje s citlivostí nádoru na chemoterapii. Jedná se o hypermetylaci promotoru genu *MGMT* u glioblastomu a kombinovanou delecii 1p/19q u oligodendrogliálních gliomů (Fadrus *et al.* 2010).



Obr.1. Časový vývoj incidence zhoubných nádorů mozku v České republice. Srovnání populace mužů, žen a celé populace. Převzato a upraveno dle Dušek *et al.* (2005).



Obr.2. Časový vývoj mortality zhoubných nádorů mozku v České republice. Srovnání populace mužů, žen a celé populace. Převzato a upraveno dle Dušek et al. (2005).

Mozkové nádory můžeme dělit do různých skupin podle dvou základních hledisek - podle stupně malignity a podle tkáňového původu.

2.1 Dělení mozkových nádorů dle stupně malignity

2.1.1 Low-grade gliomy

Low-grade gliomy jsou heterogenní skupina nádorů, jejichž histologie, genotyp, fenotyp a prognóza jsou variabilní. Představují 15% všech primárních nádorů mozku u dospělých pacientů. Často se vyskytují u mladších pacientů na rozdíl od high-grade gliomů, které se častěji objevují u starších nemocných (4. versus 6. dekáda života) (Louis *et al.* 2007). Low-grade nádory jsou obvykle dobře diferenciované. Typický je pomalý růst a minimální klinické příznaky (Fadrus *et al.* 2010). Medián přežití se pohybuje v rozmezí 5-7 let, často ale dochází k progresi do vyšších stupňů (Vertosick *et al.* 1991). Při transformaci nádoru do vyšších stupňů jsou pak častým projevem epileptické záchvaty (Louis *et al.* 2007).

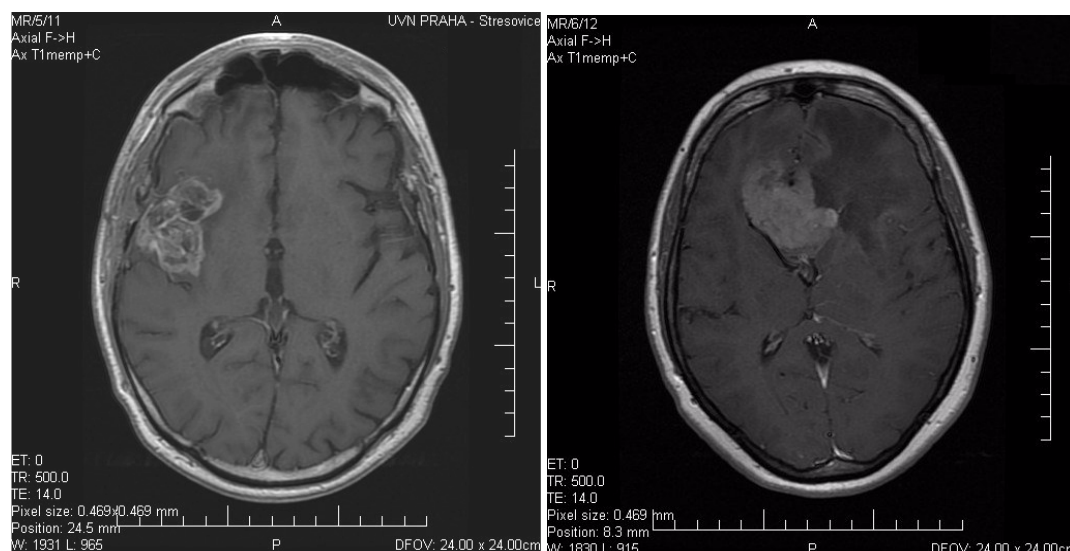
Low-grade gliomy jsou děleny do dvou maligních stupňů. Stupeň I je charakterizován benigními lézemi s nízkým proliferačním potenciálem a možností vyléčení včasnou chirurgickou resekcí. Nádory stupně II jsou naopak chirurgicky neléčitelné v důsledku infiltrace maligních buněk do okolní tkáně a často postupují do nádorů vyšších maligních stupňů (Louis *et al.* 2007). Předpokládá se, že tato progresse je spojena se ziskem chromozomálních aberací (Zemanová *et al.* 2006).

2.1.2 High grade gliomy

High-grade nádory jsou označeny stupněm malignity III a IV. Charakteristickými znaky jsou abnormální jádra, rychlá mitotická aktivita, celularita, vaskulární proliferace a přítomnost nekróz. Stupeň III, zahrnující anaplastický astrocytom a anaplastický oligodendrogliom, je charakterizován vyšší anaplazií a kratší dobou přežívání ve srovnání s pacienty s nízkostupňovými nádory.

Nejagresivnější nádory stupně IV jsou spojeny s velmi špatnou prognózou. Zvýšení počtu nekróz, posílení vaskulární proliferace a odolnost vůči záření přispívají k agresivnímu malignímu zvratu buňky (Kesari *et al.* 2011). Jediný gliom, který je řazen do nejvyššího stupně malignity, je glioblastom (Louis *et al.* 2007).

Problémem dnešní diagnostiky je odlišné zastoupení buněčných klonů v nádoru. Proto při odběru a následné analýze nemusí být hodnocena část tkáně, která objektivně reprezentuje stupeň malignity celého nádoru. Základním pravidlem každého gradingu je hodnocení oblasti s nejvyšším stupněm anaplazie, protože právě tato buněčná populace určuje průběh nemoci (Kozler *et al.* 2007).



Obr.3. Magnetická rezonance po podání kontrastní látky. Vlevo - pacient s glioblastomem. Vpravo - pacient s anaplastickým oligodendrogliomem. Převzato a upraveno dle Kozler *et al.* (2007).

2.2 Dělení mozkových nádorů dle tkáňového původu

2.2.1 Astrocytární nádory

Nejčastějším typem gliomů jsou astrocytární nádory, odvozené z astroglálních buněk. Roční incidence těchto gliomů je 4,8 případů na 100 000 obyvatel a pravděpodobnost pěti-letého přežití nemocných je pouze 15 %. Incidence nízkostupňových astrocytomů je 1,2 případů na 100 000 obyvatel. V těchto případech je procentuální počet přeživších po pěti letech od diagnózy vyšší, přežívá až 40 % pacientů, zatímco u high-grade astrocytomů je procentuální podíl pouhých 5 % (Crocetti *et al.* 2012).

Podle stupně malignity rozlišujeme pilocytické astrocytomy (stupeň I), difúzní astrocytomy (stupeň II), anaplastické astrocytomy (stupeň III) a glioblastomy (stupeň IV). (Louis *et al.* 2007). Pilocytické astrocytomy jsou nejčastějšími mozkovými nádory u dětí, ojediněle se vyskytují i u mladších dospělých jedinců (Jones *et al.* 2008). Často dochází k jejich úplnému vyléčení, protože ohraničení nádoru umožňuje provést kompletní resekci. Difúzní astrocytomy ve většině případů v dospělosti transformují do anaplastického astrocytomu až sekundárního glioblastomu. Proto lze předpokládat, že některé genetické změny nelézané u low-grade gliomů by mohly souviset s maligním zvratem nádoru (Marko *et al.* 2013). Glioblastom je neagresivnější mozkový tumor. Klinicky je dělen do dvou subtypů.

Primární glioblastom vzniká *de novo*, častěji u starších pacientů bez předchozí existence low-grade gliomů, zatímco sekundární glioblastom vzniká u mladších nemocných progresí z low-grade gliomů nebo anaplastických astrocytomů (Louis *et al.* 2007).

2.2.2 Oligodendrogliální nádory

Oligodendrogliomy jsou dobře definované nádory, vznikající v bílé hmotě mozkové kůry. Tvoří 4% primárních nádorů mozku a 12% - 20% všech gliomů (Kleihues *et al.* 2000). Řadí se mezi pomalu rostoucí primární mozkové nádory, které se obvykle vyskytují u mladých osob nebo u pacientů středního věku. Histologicky jsou charakterizovány malými kulatými buňkami s jednotnými jádry, čímž připomínají zralé oligodendrocyty (Louis *et al.* 2007).

Nádory s oligodendrogliálními komponentami, byly první mozkové tumory, u kterých byla prokázána souvislost chromosomových aberací s dobrou odpovědí na chemoterapeutickou léčbu. Pravděpodobnost pětiletého přežití těchto nemocných je podstatně vyšší než u astrocytárních nádorů, pět let od diagnostiky se dožije 55 % nemocných (Cairncross *et al.* 1998). Dle stupně malignity rozpoznáváme diferencované oligodendrogliomy stupně II a anaplastické oligodendrogliomy stupně III (Kelly *et al.* 2010).

2.2.3 Smíšené oligoastrocytární nádory

V oligoastrocytárních nádorech jsou zastoupeny buňky astrocytární i oligodendrogliální řady. Tvoří 5% až 10% všech gliomů (Kleihues *et al.* 2000). Podíl jednotlivého typu buněk v rámci nádoru je variabilní a s tím je spojené i problematické stanovení histologické diagnózy (Coons *et al.* 1997).

Oligoastrocytomy, stejně jako astrocytomy a oligodendrogliomy, lze rozdělit na vysokostupňové a nízkostupňové (Hirsmath *et al.* 2007). Do této skupiny řadíme oligoastrocytom (stupeň II) a anaplastický oligoastrocytom (stupeň III), který se obvykle vyznačuje špatnou prognózou, ačkoliv některé léze dobře reagují na chemoterapii. Genetické abnormality, které u smíšených oligoastrocytomů nalézáme, jsou kombinací změn charakteristických pro astrocytomy a oligodendrogliomy (Reifenberger *et al.* 1994).

Stupeň malignity	Subtyp nádoru
WHO Grade I	Pilocytický astrocytom
WHO Grade II	Difúzní astrocytom, oligodendrogliom, oligoastrocytom
WHO Grade III	Anaplastický astrocytom, anaplastický oligodendrogliom, anaplastický oligoastrocytom
WHO grade IV	Primární a sekundární glioblastom

Tab. 1. Rozdělení mozkových nádorů dle stupně malignity. Převzato a upraveno podle Louis *et al.* (2007).

2.3 Chromosomové aberace

Histologická diagnóza, která nebývá ve všech případech naprosto vypovídající, může být upřesněna pomocí molekulárně cytogenetických metod. Tyto metody umožnily v minulých letech definovat specifické oblasti genomu, jejichž změny souvisí s určitým subtypem gliomu a pomáhají lékařům při upřesnění diagnózy, stanovení prognózy a výběru vhodné terapie.

2.3.1 Strukturní chromosomové aberace

Ztráta heterozygozity (LOH) *TP53*

Ztráta heterozygozity tumor supresorové genu *TP53* umístěného na krátkých ramenech chromosomu 17 je nejčastější genetickou aberací spojenou obecně s nádorovými onemocněními různých typů. Ke ztrátě heterozygozity může dojít v důsledku delecí 17p, bodových mutací nebo získaných segmentálních uniparentálních disomií (UPD) (Kleihues *et al.* 1999), kdy jsou vlivem mitotické chyby přítomny na obou chromatidách identické alely tohoto genu. Jedinec se tak stává homozygotní pro danou aberaci. Tento mechanismus může vést k inaktivaci tumor supresorových genů, nebo k přítomnosti dvou kopií mutovaného onkogenu, což vede ke zvýšené proliferaci nádorových buněk (Tuna *et al.* 2009). UPD je detekovatelná metodami založenými na analýze mikrosatelitů nebo mikročipovými metodami (Maciejewski *et al.* 2008).

Protein p53 je specifický transkripční faktor, který hraje roli v celé řadě buněčných procesů, především v regulaci buněčného cyklu a programované buněčné smrti (Bögler *et al.* 1995). Ztráta funkce genu *TP53* vede k neschopnosti proteinu vázat se na DNA a nedochází tak k optimální regulaci buněčného cyklu (Louis *et al.* 1994).

Regulace p53 je zajišťována expresí genu *MDM2* (Mouse double minute 2 human homolog), který je lokalizovaný na chromosomu 12 v oblasti q14.3q15. Dvě z jeho variant váží p53, působí jako E3 ubiquitin ligáza a jsou tak jeho negativním regulátorem (Olson *et al.* 1993).

Regulace proteinu MDM2 je zajišťována proteinem p14^{ARF} (ARF tumor supressor). Tato negativní regulace zajišťuje propojení drah proteinů tumor supresorových genů *TP53* a *RB1* (Retinoblastoma protein). Hyperfosforylace pRB aktivními komplexy CDK4/6-cyklin

D (Cyclin dependent kinase 4, Cyclin dependent kinase 6), způsobí uvolnění transkripčního faktoru E2F, který indukuje transkripci genu *CDKN2* (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A). Alternativním přepisem tohoto genu následně vzniká p14^{ARF} (Zhang *et al.* 1998), který je zodpovědný za negativní regulaci MDM2. Degradace MDM2 způsobí zvýšení hladiny p53 a zástavě buněčného cyklu.

Gen *TP53* je mutován asi u dvou třetin nízkostupňových astrocytomů (Ichimura *et al.* 2000). U vysokostupňových gliomů se mutace vyskytuje jak u anaplastického astrocytomy, tak i u glioblastomy. V případě glioblastomy je mutace genu *TP53* častější u sekundárního než u primárního glioblastomy, kde se vyskytuje velmi vzácně (jen v 10%). Tento fakt podporuje hypotézu, že p53 hraje roli při formování nízkostupňových astrocytomů, ale také souvisí s progresí do nádorů vyšších stupňů (Kleihues *et al.* 1999).

U primárních glioblastomů nalézáme jiné aberace spojené s geny v molekulární dráze genu *TP53*. Jedná se například o homozygotní delece *p14*^{ARF} v oblasti 9p, nebo amplifikace genu *MDM2*, která je charakteristická pro primární glioblastomy bez mutace *TP53* (Reifenberger *et al.* 1993).

V deletované oblasti 17p jsou lokalizovány i další geny, které mohou být rovněž důležitým faktorem iniciace vzniku astrocytárních nádorů. Do této skupiny kandidátních onkogenů řadíme především *MET* a *CDK6* geny (Kitange *et al.* 2005).

Delece genu *RB1*

RB1 je tumor supresorový gen, který je lokalizován na chromosomu 13 v oblasti q14.2 a jeho protein pRB je konečným cílovým bodem kinázových komplexů CDK4/6-cyklin D. Na základě kinázové aktivity těchto komplexů dochází po hyperfosforylaci pRB, k uvolnění transkripčního faktoru E2F a následné aktivaci genů nutných pro buněčnou proliferaci (Serrano *et al.* 1993). Pokud dojde k mutaci genu *RB1* je porušena kontrola buněčného cyklu a dochází k nekontrolované proliferaci. Tento fakt odráží poměrně častý výskyt delece *RB1* u celé řady solidních tumorů i u hematologických malignit.

U mozkových nádorů je delece 13q14.2 detekována asi u jedné třetiny nemocných s vysokostupňovými astrocytomy (Kramář *et al.* 2007). U glioblastomy jsou diagnostikovány tyto aberace až u 50% sekundárních nádorů, u primárních nádorů je přítomnost aberace o něco méně častá, dosahuje cca 39%. Předpokládá se, že inaktivace tohoto genu je důležitým

faktorem při vzniku primárního i sekundárního glioblastomu (Biernat *et al.* 1997). Podle některých autorů může být ztráta exprese genu *RB1* u glioblastomů způsobena také hypermetylací jeho promotoru a tato epigenetická modifikace je považována za pozdní událost spojenou s progresí astrocytomu (Nakamura *et al.* 2001).

Další tumor supresorový gen je *p16INK4a* (*CDKN2*, cyclin-dependent kinase inhibitor), který se nalézá na chromosomu 9 v oblasti p21 (Ruas *et al.* 1998). Delece genu *p16INK4a* je charakterizována jako častá událost spojená s progresí nízkostupňového astrocytomu do astrocytomů vyšších řádů (Fallon *et al.* 2004).

p16INK4a patří mezi geny rodiny *INK*, které se podílejí na inhibiční regulaci cyklin dependentních kináz (CDK). *p16INK4a* je inhibítoem komplexů CDK 4,6/cyklin D. Tyto komplexy jsou známy především svojí kinázovou aktivitou jejichž cílovým proteinem je pRB. Pokud dojde k inhibici CDK4,6/cyklin D nedochází k fosforylaci pRB a s ní spojenému uvolnění transkripčního faktoru E2F, který aktivuje expresi genů nutných pro přechod do G1 fáze. Výsledkem je zástava buněčného cyklu (Sherr *et al.* 1999).

Chromosomové aberace zahrnující geny cyklin dependentních kináz bývají další změnou spojovanou s maligním stavem buňky, neboť dochází k neregulované fosforylaci cílových substrátů příslušných CDK. Amplifikace *CDK4* je často zaznamenávána u nádorů, nevykazujících deleci *RB1* (Schmidt *et al.* 1994).

Obvykle se delece *RB1*, delece *16INK4a*, amplifikace *CDK4* se v jednotlivých nádorech nevyskytují společně, bývá zastoupena pouze jedna změna, která stačí pro inaktivaci signální dráhy (Biernat *et al.* 1997).

Delece genu *PTEN*

PTEN (Phosphatase and tensin homolog) je nádorový supresor, který je antagonistou PI3K (phosphatidylinositol-3-kinázy) a jeho produkt defosforyluje PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) (Blume-Jensen *et al.* 2001). Protein se uplatňuje při růstu, proliferaci a migraci buněk (Duerr *et al.* 1998). Změny genu *PTEN* lokalizovaného na chromosomu 10 v oblasti q23.3, byly popsány u rakoviny prostaty, prsu a mozkových tumorů včetně glioblastomu (Li *et al.* 1997).

Porušení funkce *PTEN* může přispívat k progresi nádoru prostřednictvím narušení regulace proliferace, migrace, angiogeneze, sebeobnovy kmenových buněk a regulací dalších

molekulárních drah (Endersby *et al.* 2008). Monosomie chromosomu 10 zahrnující *PTEN* je nejčastější změna spojená s glioblastomem, vyskytující se až v 70% případů (Ohgaki *et al.* 2004). Častěji se ztráta tohoto genu vyskytuje u primárních glioblastomů (25%), u sekundárních glioblastomů je méně častá (5-10%) (Tohma *et al.* 1998).

Amplifikace genu *EGFR*

Zvýšená exprese genu *EGFR* (Epidermal growth factor receptor) má zásadní význam ve vývoji maligních gliomů mozku. *EGFR* je transmembránový buněčný receptor s tyrozin kinázovou aktivitou zodpovědný za přenos extracelulárních ligandů do buňky (Smith *et al.* 2001).

Gen *EGFR* je lokalizován na chromosomu 7 v oblasti p12. Změna exprese je způsobena jeho amplifikací, k níž dochází nejčastěji v podobě extrachromozomálních fragmentů (double minutes) s vysokým počtem genových kopií, často doprovázenou přestavbou v jeho sekvenci (Wong *et al.* 1992). Podle dostupných informací se předpokládá, že tento gen hraje významnou úlohu při difúzní infiltraci glioblastomu do okolních tkání (Okada *et al.* 2003).

Nadměrná exprese a amplifikace *EGFR* byla identifikována ve většině primárních glioblastomů (Behin *et al.* 2003), což nepřímo potvrzuje i studie (Verhaak *et al.* 2010), kde se amplifikace *EGFR* vylučovala s výskytem mutace genu *TP53*, který je spojován se sekundárním glioblastomem a vzácně se vyskytuje u glioblastomu primárního. Sekundární glioblastom je naopak spojován s výskytem aberací genu *PDGFRA* (Platelet-derived growth factor receptor A) lokalizovaným na chromosomu 4 v oblasti q12 (Behin *et al.* 2003). Hlavní role tohoto receptoru s tyrozin kinázovou aktivitou je funkce v proliferaci buňky, chemotaxi a migraci (McKinnon *et al.* 2005).

Kombinovaná delece 1p/19q

Nejčastějším nálezem, popisovaným u difúzních gliomů, je kombinovaná delece 1p/19q, která je asociována s tumory s oligodendrogliálními komponentami (Ransom *et al.* 1992). Tato aberace je popisována u 70% oligodendrogliomů a 50% smíšených oligoastrocytomů (Van den Bent *et al.* 2003).

Delece telomerické části krátkého ramene chromosomu 1, byly diagnostikovány i u dalších maligních onemocnění, což podporuje hypotézu o roli chromosomu 1 v tumorigenezi. Na základě této hypotézy se předpokládá, že na chromosomu 1 jsou lokalizovány kandidátní tumor supresorové geny, které by mohly souviset s patogenezí některých neoplázií (Smith *et al.* 1999).

Vznik kombinované delece 1p/19q souvisí s nebalancovanou translokací der(1)t(1;19)(q10;p10), při které vzniká derivovaný chromosom 1 složený z krátkých ramen chromosomu 1 a krátkých ramen chromosomu 19. V důsledku této aberace dochází tedy k parciální delecí 1p a 19q (Kelly *et al.* 2010). U difúzních gliomů dochází nejčastěji ke ztrátám v oblasti 1p36 mezi genetickými markery D1S1612 a D1S468 (Smith *et al.* 1999). Tato aberace se nejčastěji vyskytuje u oligodendrogliomů, zatímco u astrocytární řady je diagnostikována vzácně (Ino *et al.* 2001). Delece 19q, zahrnující oblast 19q13.3 mezi genetickými markery D19S412 a D19S596, se vyskytuje u astrocytární, oligodendrogliální i smíšené řady gliomů, naopak je velmi vzácná u dalších malignit. Proto lze v této oblasti předpokládat výskyt tumor supresorového genu, který je specifický právě pro gliomy (Smith *et al.* 1999).

Podle některých studií je nález kombinované delece 1p/19q u anaplastických oligodendrogliomů spojen s dobrou odpovědí na chemoterapeutickou léčbu (Schmidt *et al.* 2002) a zároveň se tak prodlužuje délka života pacienta (Van den Bent *et al.* 2003). Prognostická relevance této aberace byla potvrzena prostřednictvím dvou prospektivních klinických studií. Jedna studie byla prováděna v rámci Radiační terapie onkologické společnosti (RTOG), další pod vedením Evropské organizace pro výzkum a léčbu rakoviny (EORTC) (Cairncross *et al.* 2006, Van den Bent *et al.* 2003). Obě retrospektivní studie ukazují, že nádory s kombinovanou delecí 1p/19q vykazují lepší odpověď na chemoterapeutickou léčbu než nádory bez této aberace (Cairncross *et al.* 1998).

2.3.2 Numerické chromosomové aberace – aneuploidie

Vznik aneuploidií je jedním z důsledků nestability genomu nádorových buněk. U buněk mozkových gliomů jsou často nalézány trisomie a monosomie jednotlivých chromosomů. Obecně se předpokládá, že tyto numerické aberace souvisí se ztrátou tumor supresorových genů, či naopak amplifikací onkogenů (Duesberg *et al.* 2003), které hrají roli v patogenezi mozkových gliomů.

Ztráta chromosomu 10 je nejčastější aneuploidií v buňkách glioblastomů (Loeper *et al.* 2001). Jedná se o ztráty celých chromosomů nebo segmentální delece oblasti 10q22-qter (Vranová *et al.* 2007). Ztráty chromosomu 10 jsou často asociovány se zvýšenou expresí genu *EGFR* lokalizovaného na chromosomu 7 (Yadav *et al.* 2009, Vranová *et al.* 2007) a tyto soubežné změny se vyznačují špatnou prognózou (Arslantas *et al.* 2004). Podle studie Yadav a kol. (2009) se na chromosomu 10 vyskytuje tumor supresorový gen *AXA7* (Annexin A7) lokalizovaný v oblasti q21.1q21.2.

Trisomie, nebo polysomie chromosomu 7, je další častá aneuploidie, vyskytující se u low-grade i high-grade nádorů. Studie zaměřené na amplifikaci chromosomu 7 popisují tyto změny u více než 50% případů (Reifenberger *et al.* 2004). Získ genetického materiálu na dlouhých ramenech chromosomu 7 (7q) by pravděpodobně mohl souviset s tumorigenezí u astrocytárních nádorů (Arslantas *et al.* 2004). Některé studie zabývající se touto problematikou ukázaly, že onkogen *MET*, který se nachází v oblasti 7q31 a kóduje růstový faktor hepatocytů a „scatter“ receptorový faktor, bývá amplifikován přibližně u 20% astrocytárních nádorů (Hirose *et al.* 2004).

2.3.3 Epigenetické modifikace

Hypermetylace promotoru *MGMT*

Nedávné pokroky v moderních molekulárně cytogenetických technologiích umožňují komplexnější vyšetření změn v nádorových buňkách. Analýza epigenetických modifikací, zejména metylací genových promotorů, přispěly k lepšímu pochopení patogeneze nádorů.

Nejčastější epigenetická modifikace u mozkových nádorů je hypermetylace promotoru genu *MGMT* (O6-methylguanin-DNA- methyltransferáza) (Cankovic *et al.* 2013). Tento gen, který je lokalizován na krátkém rameni chromosomu 10 kóduje reparační protein MGMT (Natarajan *et al.* 1992). Protein MGMT odstraňuje alkylovou skupinu z pozice O6-guaninu, což je významná pozice z hlediska DNA alkylace. Vysoká exprese MGMT podporuje odolnost a rezistenci na alkylační cytostatika, jako je například temozolomid, neboť dochází k neutralizaci cytotoxických účinků alkylačního činidla (Silber *et al.* 2012). Temozolomid je DNA-metylační činidlo, které přidává metylovou skupinu do O6 pozice guaninových zbytků DNA, což způsobuje u rychle se dělících buněk chyby v párování, dvouvláknové zlomy DNA a apoptózu (Esteller *et al.* 2000).

Snížená exprese MGMT způsobená umlčením transkripce v důsledku hypermetylace CpG ostrůvků, podporuje cytotoxicitu alkylačních činidel. Tato epigenetická změna je nalézána u různých typů lidských nádorů, včetně glioblastomů. Někteří autoři poukazují na dvě kritické oblasti (DMR1, DMR2), přičemž v oblasti DMR2 se nachází několik CpG míst, které mají rozhodující roli v kontrole transkripční aktivity genu *MGMT* (Malley *et al.* 2011).

Většina glioblastomů s hypermetylovaným promotorem genu *MGMT* vykazuje zároveň monosomii chromosomu 10. V důsledku toho stačí metylace pouze jedné alely ke kompletní ztrátě exprese *MGMT* (Sciuscio *et al.* 2011).

3 Cíle práce

Provést detailní molekulárně-cytogenetickou analýzu genomu nádorových buněk u nemocných s histologicky potvrzenými mozkovými nádory

- Metodou I-FISH sledovat frekvenci známých chromosomových aberací v různých nádorových subtypech
- Porovnat nálezy u nemocných s nízkostupňovými a vysokostupňovými gliomy
- Metodou SNP array sledovat nebalancované změny v různých nádorových subtypech
- Porovnat výsledky obou metod
- Posoudit potenciální význam rekurentních změn při progresi nádoru

4 Materiál

4.1 Chemikálie a roztoky používané pro přípravu buněčných suspenzí

- 0,075 M KCl (lékárna VFN)
- Metanol (Penta)
- Kyselina octová (Penta)
- Redestilovaná voda
- PBS (lékárna VFN)
- Odběrové médium (100 ml PBS) Fixační roztok (kyselina octová a metanol v poměru 1:3)
- Hypotonický roztok (2,796g 0,075 KCl v 500 ml redestilované vody)

4.2 Chemikálie a roztoky používané pro I-FISH

- 2×SSC (lékárna VFN)
- Rubber cement (Marabu)
- DAPI/antifade (Vector)
- Vysis LSI Hybridization Buffer (Abbott Molecular)
- Redestilovaná voda
- Značené DNA sondy Vysis (Abbott Molecular)
- Imerzní olej (Carl Zeiss)
- Alkoholová řada :

70% alkohol (58 ml 95% ethanolu, 22 ml redestilované H₂O), 85% alkohol (70,5 ml 95% ethanolu, 9,5 ml redestilované H₂O), 95% ethanol (lékárna VFN)

- Mycí roztoky:

0,4×SSC (450 μ l 0,05% Tween 20, 100ml 20×SSC, 400ml redestilované H₂O), 2×SSC/0,1% NP40 (50 ml 20×SSC, 449,5 ml redestilované H₂O, 0,5 ml NP40)

4.3 Chemikálie a roztoky používané pro izolaci DNA z periferní krve a mozkové tkáně

- 100% ethanol (Penta)
- Agaróza (Top-Bio s.r.o)
- Eluační pufr AE (Qiagen, Sigma)
- Lyzační pufr ATL (Qiagen, Sigma)
- PBS (lékárna VFN)
- PCR vkládací pufr (Top-Bio s.r.o)
- Proteáza K (Qiagen, Sigma)
- Odmývací pufr AW1 (Qiagen, Sigma)
- Odmývací pufr AW 2 (Qiagen, Sigma)
- RedGel (Biotium)
- TBE pufr (Sigma)
- TAE pufr (Penta)
- Přípravný pufr (Sigma)

4.4 Chemikálie a roztoky používané pro SNP array

- 100% ethanol (Penta)
- 100% 2-propanol (Penta)
- 95% formamide (Penta)
- EDTA (Penta)
- NaOH (Illumina)
- Neutralizační roztok MA2 (Illumina)
- Fragmentační pufr FMS (Illumina)
- Amplifikační roztok MSM (Illumina)
- FMS roztok (Illumina)
- PM1 roztok (Illumina)
- RA1 roztok (Illumina)
- PB1 pufr (Illumina)
- XC1 roztok (Illumina)

- XC2 roztok (Illumina)
- XC3 roztok (Illumina)
- XC4 roztok (Illumina)
- TEM roztok (Illumina)
- STM roztok (Illumina)
- ATM roztok (Illumina)

4.5 Programy a databáze

- Počítačová analýza obrazu, software ISIS (MetaSystems, Německo) pro FISH, m/FISH a m/BAND Microsoft Office Excel
- KaryoStudio (verze 1.4.3.0) (Illumina)
- GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

5. Metody

5.1 Sběr materiálu, informovaný souhlas pacientů, klinicko-patologická data

Ve studii byly použity vzorky tkání celkem 35 nemocných s histologicky prokázanými gliomy, kteří byli v letech 2012-2015 operováni na Neurochirurgické a neuroonkologické klinice 1. LF UK a ÚVN v Praze a na Neurochirurgickém oddělení KN v Liberci. Spolu s tkáněmi a periferní krví nemocných byla získána také jejich histologicko-patologická data. Všem pacientům byl předložen formulář pro informovaný souhlas a do projektu byli zařazeni jen nemocní, kteří s odběrem vzorků pro výzkumné účely souhlasili. Mozková tkáň byla odebrána během plánovaných rutinních neurochirurgických operací a nepředstavovala pro pacienta žádnou další zátěž. V rámci kontrolní skupiny byly vyšetřeny vzorky nenádorové mozkové tkáně odebrané při běžných neurochirurgických operacích pacientům s epilepsií.

5.2 Zpracování vzorků mozkových nádorů a periferní krve

5.2.1 Odběr a zpracování TK vzorků

- Na neurochirurgické byly vzorky mozkové tkáně po operaci odebírány do předem připravených odběrových zkumavek s 1×PBS
- Takto odebrané tkáňové vzorky byly následně odeslány do laboratoře CNC, kde jsme je rozdělili na dva díly. Oba vzorky jsme homogenizovali v odběrovém PBS médiu pomocí pipety dokud jsme nezískali homogenní buněčnou suspenzi
- Zvážili jsme dvě eppendorf zkumavky o objemu 1,5 ml na analytických vahách, zapsali váhu a horní část zkumavky jsme označili příslušným číslem vzorku
- Do zvážených a označených mikrozukumavek jsme převedli po 250 µl připravené buněčné suspenze
- Zkumavky s odměřeným vzorkem mozkové tkáně jsme centrifugovali 5 minut v chlazené centrifuze při 14000 rpm/min při teplotě 4°C
- Opatrně jsme odebrali supernatant a zkumavky jsme znovu zvážili

- Odečetli jsme od sebe obě vážení, abychom zjistili aktuální hmotnost vzorku ve zkumavce. Optimální hmotnost by se měla pohybovat mezi 15-25 μ l, ale nikdy nesmí být vyšší než 25 μ l
- Pokud byla hmotnost vzorku menší, přidali jsme 100 μ l buněčné suspenze a opakovali centrifugaci, odstranění supernantu a vážení dokud jsme nedostali požadovanou hmotnost
- Takto připravený vzorek jsme skladovali v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C
- Každý ze vzorků jsme použili na jedno vyšetření metodou I-FISH a/nebo SNP array

5.2.2 Odběr a zpracování vzorků periferní krve

- Na příslušném neurochirurgickém oddělení bylo odebráno 1-2ml periferní krve do zkumavky s K3EDTA a vzorek byl následně odeslán do laboratoře CNC
- Vzorky jsme krátkodobě skladovali při teplotě 4°C

5.3 Interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH)

K detekci známých rekurentních chromosomových aberací v gliálních buňkách jsme použili metodu I-FISH s panelem lokus-specifických a/nebo α -satelitních DNA sond Vysis od firmy Abbott Molecular. Tyto sondy jsou přímo značené fluorochromy Spectrum Orange a/nebo Spectrum Green. Sledovali jsme nejčastější chromosomové aberace, tj. delece tumor-supresorových genů *TP53*, *CDKN2A* a *RB1*, delece chromosomových oblastí 1p36 a 19q13, amplifikace *EGFR* genu, trisomie chromosomu 7 a monosomie chromosomu 10. Při jejich aplikaci jsme postupovali podle návodů doporučených výrobcem.

5.3.1 Příprava preparátů pro I-FISH

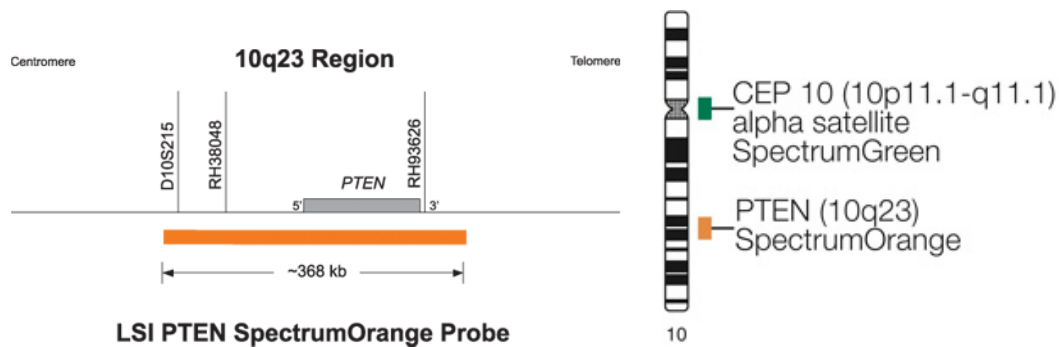
- Archivovanou buněčnou suspenzi jsme rozmrazili a vzorek jsme centrifugovali 5min při 2000 rpm/min
- K suspenzi jsme přidali hypotonický roztok (0,075 M KCl, 5-10ml vody) Buněčnou suspenzi jsme inkubovali v termostatu 20 min při 37°C

- Směs vzorku a hypotonického roztoku jsme centrifugovali opět 5 min, při 2000 rpm
- Odsáli jsme supernatant a ke zbylému sedimentu jsme za neustálého třepání přidávali po kapkách fixační roztok (metanol a kyselina octová v poměru 3:1) Sediment jsme centrifugovali 5 min při 2000 rpm
- Tento proces (přidání fixačního roztoku a centrifugaci) jsme opakovali celkem třikrát
- Po poslední fixaci jsme takto připravenou suspenzi ve fixačním roztoku uložili do lednice při 4-7°C
- Po dvanácti hodinách jsme suspenzi centrifugovali 5 min při 2000 rpm a pokojové teplotě (RT, room temperature), následně jsme odsáli supernatant a sediment pomocí pipety resuspendovali ve fixačním roztoku v množství, které odpovídalo hustotě vzorku
- Nakapali jsme několik kapek buněčné suspenze z výšky cca 50 cm na mikroskopické podložní sklo a nechali zaschnout při pokojové teplotě
- Po zaschnutí jsme ve světelném mikroskopu zkontrolovali hustotu buněčných jader na preparátu a popřípadě jsme ji upravili přidáním několika kapek fixačního roztoku nebo zahuštěním suspenze
- Preparáty o požadované hustotě jsme uchovávali při pokojové teplotě
- Nspotřebovanou buněčnou suspenzi jsme uložili v mrazáku při teplotě -18 až -20°C pro případné další použití

5.3.2 Přehled použitých DNA sond

LSI *PTEN* Spectrum Orange/CEP 10 alpha satellite Spectrum Green

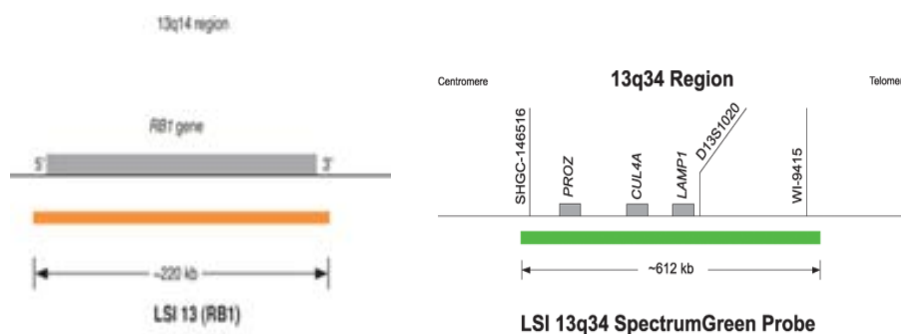
- Spectrum Orange - lokus specifická sonda s rozsahem 368 kb komplementární k oblasti 10q23 a zahrnující lokusy D10S215, RH3048 a RH93626, kde je lokalizován gen *PTEN*
- Spectrum Green - α -satelitní DNA sonda komplementární k centromerické oblasti 10p11.1-q11.1 soužící jako kontrola



Obr.4. Sonda LSI *PTEN*/CEP 10. Převzato a upraveno podle Abbott Molecular.

LSI *RB1* Spectrum Orange/ LSI 13q34 Spectrum Green

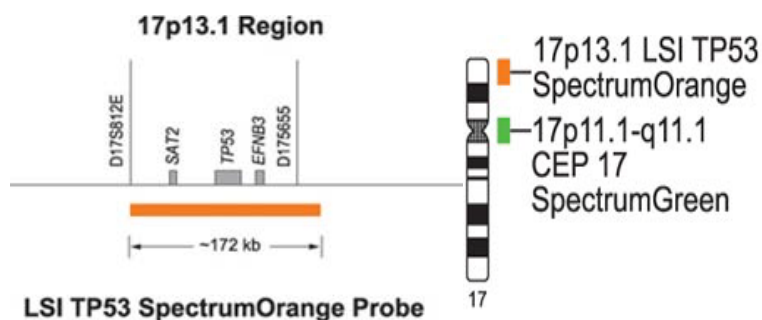
- Spectrum Orange - lokus specifická sonda s rozsahem 220 kb komplementární k oblasti 13q14, kde je lokalizován gen *RB1*
- Spectrum Green - lokus specifická sonda s rozsahem 620 kb komplementární k oblasti 13q34 zahrnující lokusy SHGC-146516, D13S1020, a WI-9415 kde jsou lokalizovány geny *PROZ*, *CUL4A* a *LAMP1*, která slouží jako kontrola



Obr.5. Sonda LSI *RB1*/ LSI 13q34. Převzato a upraveno podle Abbott Molecular.

LSI *TP53* Spectrum Orange/CEP 17 alpha satellite Spectrum Green

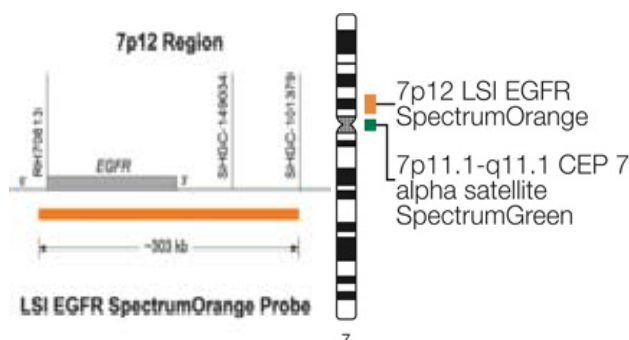
- Spectrum Orange - lokus specifická sonda s rozsahem 172 kb komplementární k oblasti 17p13.1 zahrnující lokusy D17S812E a D1676755 kde jsou lokalizovány geny *SAT2*, *TP53* a *EFNB3*
- Spectrum Green - α -satelitní DNA sonda komplementární k centromerické oblasti 17p11.1- q11.1 sloužící jako kontrola



Obr.6. Sonda LSI *TP53*/CEP 17. Převzato a upraveno podle Abbott Molecular.

LSI *EGFR* Spectrum Orange/CEP 7 alpha satellite Spectrum Green

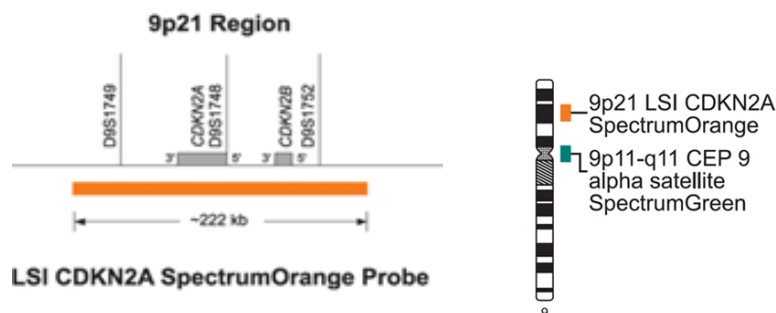
- Spectrum Orange - lokus specifická sonda s rozsahem 303 kb komplementární k oblasti 7p12 zahrnující lokusy RH70813, SHGC-149034 a SHGC-101379 kde je lokalizován gen *EGFR*.
- Spectrum Green - α -satelitní DNA sonda komplementární k centromerické oblasti 7p11.1- q11.1 sloužící jako kontrola.



Obr.7. Sonda LSI *EGFR*/ CEP 7. Převzato a upraveno podle Abbott Molecular.

LSI *p16* (*CDKN2A*) Spectrum Orange/CEP 9 alpha satellite Spectrum Green

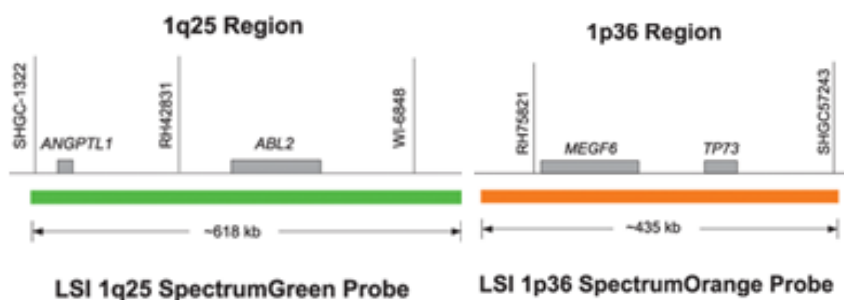
- Spectrum Orange - lokus specifická sonda s rozsahem 222 kb komplementární k oblasti 9p21 zahrnující lokusy D9S1749, D9S1748 a D9S1752 kde jsou lokalizovány geny *CDKN2A* a *CDKN2B*
- Spectrum Green - α -satelitní DNA sonda komplementární k centromerické oblasti 9p11.1- q11.1 sloužící jako kontrola



Obr.8. Sonda LSI *p16* (*CDKN2A*)/CEP 9. Převzato a upraveno podle Abbott Molecular.

VYSIS LSI 1p36 Spectrum Orange/LSI 1q25 Spectrum Green

- Spectrum Orange - lokus specifická sonda s rozsahem 435 kb komplementární k oblasti 1p36 zahrnující lokusy RH75821 a SHGC57243 kde jsou lokalizovány geny *MEGF6* a *TP73*
- Spectrum Green - lokus specifická sonda s rozsahem 616kb komplementární k oblasti 1q25 zahrnující lokusy SHGC-1322, RH42831 a WI-6848 kde jsou lokalizovány geny *ANGPTL1* a *ABL2*, která slouží jako kontrola

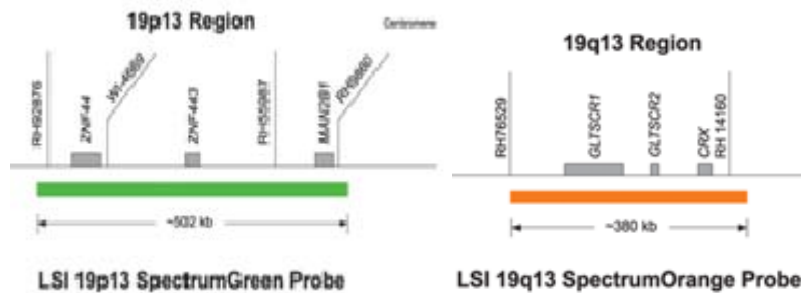


Obr.9. Sonda LSI 1p36 /LSI 1q25. Převzato a upraveno podle Abbott Molecular.

VYSIS LSI 19p13 Spectrum Orange/LSI 19q13 Spectrum Green

- Spectrum Green - lokus specifická sonda s rozsahem 502 kb komplementární k oblasti 19q13 zahrnující lokusy RH92876, WI-4669, RH55987 a RH9860 kde jsou lokalizovány geny *ZNF44*, *ZNF443* a *MAN2B1*

- Spectrum Orange - lokus specifická sonda s rozsahem 380 kb komplementární k oblasti 19p13 zahrnující lokusy RH76529a RH 14160 kde jsou lokalizovány geny *GLTSCR1*, *GLTSCR2* a *CRX*, která slouží jako kontrola



Obr.10. Sonda LSI 19q13/LSI 19p13. Převzato a upraveno podle Abbott Molecular.

5.3.3 Příprava preparátů pro I-FISH

- Mikroskoipické preparáty s nakapanou buněčnou suspenzí jsme vložili na 20 minut do roztoku 2×SSC, pH=7, při teplotě 37°C
- Po vyjmutí jsme vzorek dehydratovali ve vychlazené vzestupné alkoholové řadě (70%, 85%, 95% etanol), vždy dvě minuty v každém roztoku
- Skla jsme nechali uschnout ve svislé poloze při RT

5.3.4 Příprava sond a aplikace DNA sond

- Sondy potřebné k hybridizaci jsme vyndali z mrazáku a nechali 5 minut rozmrazit ve tmě při RT
- Mikrozkušavky se sondami jsme důkladně protřepali na vortexu (Biotech International, Německo) a následně krátce centrifugovali na stolní mikrocetrifuze tak, aby došlo k usazení veškeré sondy na dně zkumavky
- Hybridizační směs jsme připravili smícháním 0,5 µl sondy, 2 µl vody pro injekce, a 7 µl hybridizačního pufu na jeden vzorek
- Připravenou hybridizační směs jsme opět důkladně protřepali na vortexu a centrifugovali na stolní mikrocetrifuze

- Na histologicko plotnu předeřátou na 37°C jsme rozložili krycí sklíčka o velikosti 22x22 mm a nanесли na ně připravenou hybridizační směs
- Následně jsme na krycí skla opatrně přiložili připravený mikroskopický preparát se vzorkem, tak aby pokud možno nevznikly bubliny (případné bubliny jsme vytlačili jemným tlakem na krycí sklo).
- Krycí skla jsme po celém obvodu oblepili ruber cementem tak, aby při hybridizaci nedošlo k vysychání hybridizační směsi
- Pro lepší orientaci při mikroskopické analýze jsme označili pozici sond z druhé strany skla diamantovým perem
- Skla jsme vložili do automatického hybridizačního bloku (HYBride, TermoBrite, Aabbott Molecular), do kterého jsme předtím vložili do příslušných drážek navlhčenou buničinu.
- Spustili jsme automatický program pro denaturaci a hybridizaci dle doporučení výrobce (denaturace 2 min při 73°C a hybridizace do druhého dne při 42°C)

5.3.5 Mytí preparátů po hybridizaci

- Skla, která jsme nechali 16-24 hodin hybridizovat jsme následující den vyndali z HYBridu
- Odstranili jsme rubercement, krycí skla a preparáty umístili do speciální kyvety a vložili do přístroje na automatické odmytí VP 2000 Processor (Abbott Molecular)
Spustili jsme přednastavený automatický program na rychlé mytí preparátů, který se skládá z následujících kroků: 2min 0,4×SSC/0,3% NP-40 při 73°C, 1min 2×SSC/0,1% NP-40 při RT, 2 min dehydratace v chlazené vzestupné alkoholové řadě (70%, 85%, 95% alkohol)
- Odmyté a dehydratované preparáty jsme usušili ve tmě při RT
- Na suché preparáty jsme nanесли 25 µl komerčně dodávané směsi DAPI/antifade (Vectashield Mounting medium, Vector) a opatrně přiložili krycí sklo 22×60mm, tak aby nevznikly bubliny (případné bubliny jsme jemně vytlačili pomocí filtračního papíru)
- Takto připravená skla jsme uložili do mrazáku, kde mohou být uchovávána i dluhodobě

5.3.6 Analýza ve fluorescenčním mikroskopu

K vyhodnocení preparátů jsme použili fluorescenční mikroskop Axio Imager 1 (Carl Zeiss, Německo). Mikroskop je vybaven specifickými velmi úzkými optickými filtry, které umožňují analýzu fluorescenčních signálů a detekci příslušným DNA sond navázaných ke komplementárním úsekům fixovaným na mikroskopickém preparátu. Hodnotili jsme 200 interfázních jader na každou hybridizační směs při zvětšení 1000x za pomoci imerzního oleje. Každý preparát byl hodnocen dvěma nezávislými pozorovateli, z nichž každý hodnotil 100 jader. U každého vzorku jsme pro dokumentaci nasnímali několik obrázků z mikroskopu pomocí integrované velmi citlivé CCD kamery do počítače, kde jsme je pomocí programu počítačové analýzy obrazu *ISIS* od firmy MetaSystems upravili do přijatelné kvality. Pro určení pozitivních nálezů jsme na základě vyšetření kontrolního souboru stanovili tzv. hranici cut-off. Nálezy nad touto hranicí jsou považovány za patologické. Tuto hranici jsme stanovili na 2,5% buněk pro amplifikace a nadpočetné chromosomy a 5% pro delecce a monosomie (Zemanová *et al.* 2006). Výsledky jsme popsali podle mezinárodní ISCN nomenklatury (2013).

5.4 Izolace DNA z mozkové tkáně

Z buněčné pelety jsme izolovali gDNA (Genomic DNA). Pro izolaci gDNA z buněk mozkových gliomů jsme použili QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen Inc., Germantown, MD).

- Do izolační eppendorf zkumavky jsme přenesli část homogenizované tkáně v PBS
- Centrifugovali jsme na stolní centrifuze
- Odsáli jsme supernatant a následně jsme vzorek zvážili (
- Přidali jsme 180 µl lyzačního pufru ATL a resuspendovali vzorek protřepáními na vortexu .
- Přidali jsme 20 µl proteázy K, protřepali na vortexu a centrifugovali ve stolní centrifuze
- Inkubovali jsme vzorek při 56°C na třepacím heat bloku (Tecan, Švýcarsko) po dobu 18 hodin

- Po inkubaci jsme vzorek centrifugovali ve stolní centrifuze
- Přidali jsme 200 µl AL pufru
- Protřepali jsme vzorek na vortexu a centrifugovali ve stolní centrifuze
- Inkubovali jsme 10 minut při 70°C a poté opět centrifugovali ve stolní centrifuze
- Přidali jsme 200 µl 96% etanolu a pečlivě propipetovali. Tento krok je zásadní pro dostatečnou výtěžnost DNA
- Vzorek jsme protřepali na vortexu a centrifugovali ve stolní centrifuze
- Přenesli jsme směs na izolační kolonku
- Centrifugovali jsme směs při 8000 rpm/1 min
- Odebrali jsme supernatant, a umístili novou sběrnou zkumavku
- Přidali jsme 500 µl promývacího AW1 pufru
- Centrifugovali jsme při 8000 rpm/1 min
- Odebrali jsme supernatant a umístili novou sběrnou zkumavku
- Přidali 500 µl promývacího AW2 pufru
- Centrifugovali jsme při 14000 rpm/3 min
- Odebrali jsme supernatant a použili novou sběrnou zkumavku
- Centrifugovali jsme bez přidání chemikálie 14000 rpm/1 min
- Přenesli jsme do čisté ependorf zkumavky
- Elulovali jsme v 55 ml eluačním pufru AE pufru 5 minut
- Centrifugovali při 8000 rpm/1 min
- Výslednou koncentraci a čistotu eluátu jsme změřili spektrofotometricky

5.5 Izolace DNA z periferní krve

Pro izolaci gDNA z periferní krve jsme použili GenElute™ Blood Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich Co. LLC.).

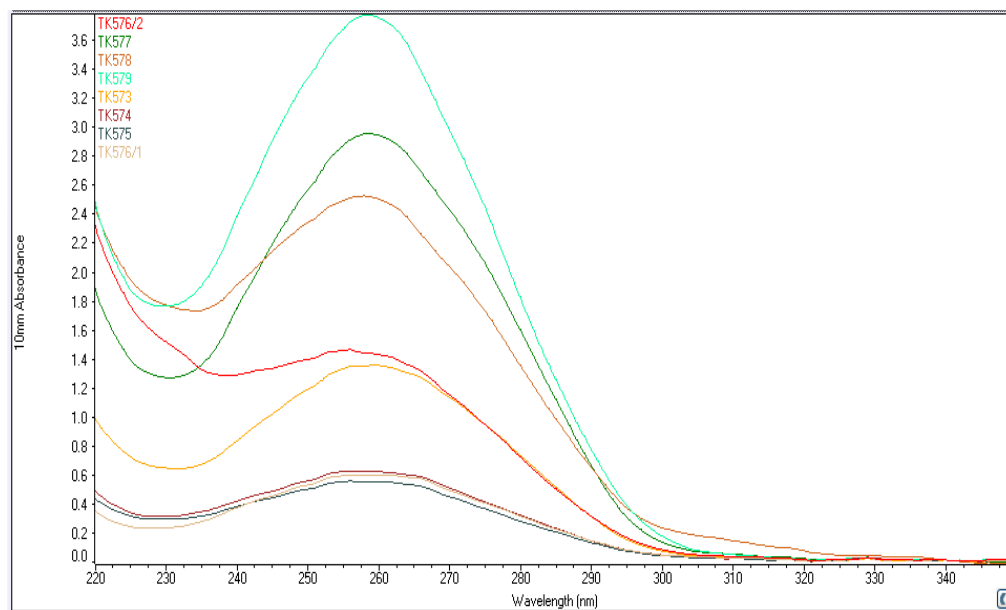
- Do 1,5 ml sterilní mikrozukavky jsme přidali 20 µl proteázy K
- Přidali jsme 200 µl krevního vzorku pacienta
- Přidali jsme 200 µl lyzačního AL pufru
- Protřepali jsme vzorek na vortexu a inkubovali při 56°C na tepelném bloku (Lab System, Česká republika)

- Po inkubaci jsme přidali 500 μ l přípravného roztoku (preparation solution)
- Centrifugovali jsme směs při 8000 rpm/1 min
- Přidali jsme 200 μ l 100% ethanolu a krátce jsme vorek protřepali na vortexu
- Výslednou směs jsme přelili do filtrační kolonky vložené v mikrozkušavce o objemu 2 ml
- Centrifugovali jsme vzorek při 8000 rpm /20°C /1 min
- Odebrali jsme supernatant a umístili novou sběrnou 2 ml mikrozkušavku
- Přidali jsme 500 μ l promývacího roztoku AW1
- Centrifugovali jsme vzorek při 8000 rpm /20°C/1 min
- Odebrali jsme supernatant a umístili novou sběrnou 2 ml mikrozkušavku
- Přidali jsme 500 μ l promývacího roztoku AW2
- Centrifugovali jsme vzorek při 14000 rpm /20°C/3 min
- Odebrali jsme supernatant a umístili novou sběrnou 1,5 ml mikrozkušavku
- Elulovali jsme v 55 ml eluačním pufru AE pufru 5 minut
- Centrifugovali při 8000 rpm/1 min.
- Výslednou koncentraci a čistotu eluátu jsme změřili spektrofotometricky

5.6 Kontrola koncentrace a kvality DNA

5.6.1 Měření spektrofotometrem

Výslednou koncentraci a čistotu eluátu jsme změřili spektrofotometrem NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware). Po zkalibrování spektrofotometru jsme nanесли na šterbinu 1,5 μ l gDNA. Koncetrace DNA byla stanovena měřením absorbance při 260 nm a kontaminace vzorku měřením při 260 a 280 nm. Podle zjištěných výsledků jsme zvolili další postup. Pokud bylo třeba izolovanou gDNA ředit, použili jsme Tris-edta. Pokud byla koncentrace nízká, zvýšili jsme koncentraci výparem 60°C po dobu 8 minut. Údaje o čistotě DNA vyjadřuje Ratio hodnota, která pro protokol SNP array musí být v rozmezí 1,8-3ng/ μ l.



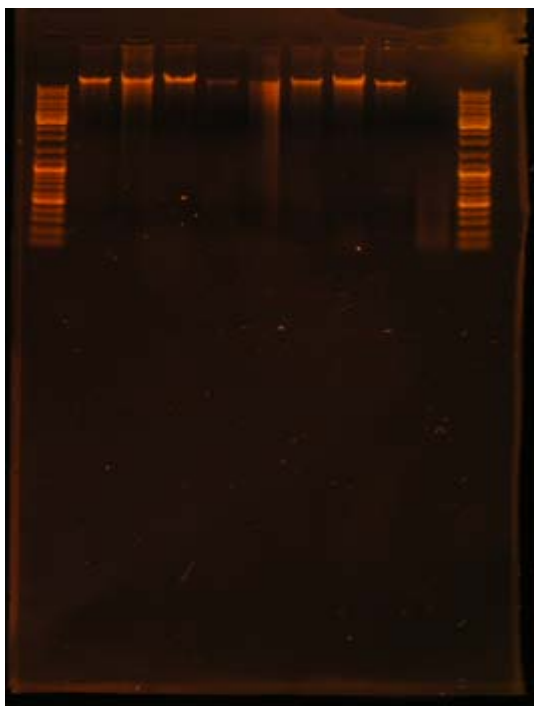
Graf.1. Kontrola koncentrace spektrofotometrem.

5.6.2 Gelová elektroforéza

Kvalitu izolované DNA jsme změřili pomocí gelové elektroforézy v 1% agarózovém gelu při napětí 80-120 V.

Příprava gelu

- Navážili jsme 0,6 g 100% agarózy
- Rozmíchali jsme agarózu v 60ml TAE
- Zahřívali jsme v mikrovlnné troubě za občasného protřepávání, než se agar zcela rozpustil
- Po rozpuštění jsme agar ochladili na optimální teplotu (37°C)
- Do gelu jsme napipetovali 6 µl Red Gel
- Umístili jsme vzorek do elektroforézy
- Ke každému vzorku jsme přidali PCR vkládací puf
- Vzorky jsme napipetovali do připravených komůrek, do jedné jsme navíc napipetovali referenční DNA
- DNA byla vizualizována UV zářením a vyfocena



Obr.11. Kontrola koncentrace spektrofotometrem

5.7 Metoda SNP array

K detekci nebalancovaných změn v genomu buněk mozkových gliomů jsme využili metody SNP array s DNA čipy Human CytoSNP-12 BeadChip (Illumina, San Diego). Metoda je založena na komplementaritě jednotlivých bází a hybridizaci fragmentované jednovláknové DNA na pole obsahující stovky tisíc sond s jedinečnou nukleotidovou sekvencí (LaFramboise, *et al.* 2009). Na mikročipu je umístěno několik vláken DNA sekvencí, které se liší v místě polymorfismu jedinou bází. Následně je při hybridizaci využito principu perfektní shody (perfekt match) nebo omylu (mismatch). Tedy nejstabilnější komplex je část fragmentu a sondy, kde dochází k dokonalé shodě, zatímco u ostatních komplexů DNA - sonda kde nedošlo k přesné shodě, je stabilita nižší a s tím souvisí i nižší bod tání (Matsuzaki *et al.* 2004). Při následném omývání čipů je nedostatečně navázaná DNA odstraněna, zatímco fragmenty, kde došlo k dokonalé shodě se sondou, zůstávají na čipu. Výsledný produkt byl naskenován pomocí skeneru iScan Microarray Reader (Illumina, San Diego) a výsledky byly analyzovány v programu Illumina KaryoStudio (verze 1.4.3.0).

Použitá metoda Infinium® HD Assay probíhá ve 3 dnech.

1. den

Denaturace, neutralizace a amplifikace DNA

- Předehřáli jsme si hybridizační pec (Illumina, San Diego) na 37°C
- Na destičku jsme nanесли 200 ng gDNA v celkovém objemu 4 µl
- Přidali jsme 4 µl 0.1N NaOH
- Protřepali jsme na vortexu
- Centrifugovali jsme při 280xg /1 min
- Inkubovali jsme 10 min (RT) Přidali jsme 34 µl neutralizačního roztoku MA2 a 3 µl amplifikačního pufru MSM obsahujícího pravděpodobně náhodné primery (hexamery) a Phi29 DNA polymerázu s proofreadingovou aktivitou
- Protřepali jsme na vortexu při 1600 rpm/1 min
- Centrifugovali jsme při 280xg /1 min
- Amplifikovali jsme 21 hodin při 37°C v hybridizační peci

2. den

- 1. Enzymatická fragmentace, pravděpodobně s použitím uracil DNA glykosylasy
Předem jsme zahřáli FMS fragmentační pufr (RT) a centrifugovali při 280xg
- Destičku jsme vyndali z hybridizační pece a centrifugovali při 50xg/1 min. Přidali jsme 25 µl FMS ke každému vzorku
- Protřepali jsme na vortexu
- Centrifugovali jsme při 50xg/1 min při 22°C
- Inkubovali jsme destičku 1 hodinu na vyhřívaném bloku při 37°C (Illumina, San Diego)

2. Precipitace fragmentované DNA s využitím 2-propanolu a PM1

- Předehřáli jsme hybridizační pec na 37°C
- PM1 roztok jsme zahřáli (RT) a centrifugovali při 280xg/1 min
- Přidali jsme 50 µl PM1 (roztok modrého dextranu) ke každému vzorku
- Protřepali jsme na vortexu
- Inkubovali jsme destičku 5 min na vyhřívaném bloku při 37°C

- Centrifugovali jsme při 50xg/1 min při 22°C
- Přidali jsme 155 µl 100% 2-propanolu ke každému vzorku
- Inkubovali jsme destičku 30 min při 4°C Centrifugovali jsme při 3000xg/20 min při 4°C
- Odstranili jsme supernatant a nechali 1h vysušit modrou peletu (RT)

- 3. Rozpuštění pelety DNA s využitím RA1
- Předehřáli jsme hybridizační pec (Illumina, San Diego) na 48°C
- Přidali jsme 23 µl RA1 k DNA peletě každého vzorku
- Inkubovali jsme destičku v hybridizační peci 1 hod při 48°C
- Protřepali jsme na vortexu
- Centrifugovali jsme krátce při 280xg

4. Nanesení DNA na Beadchip

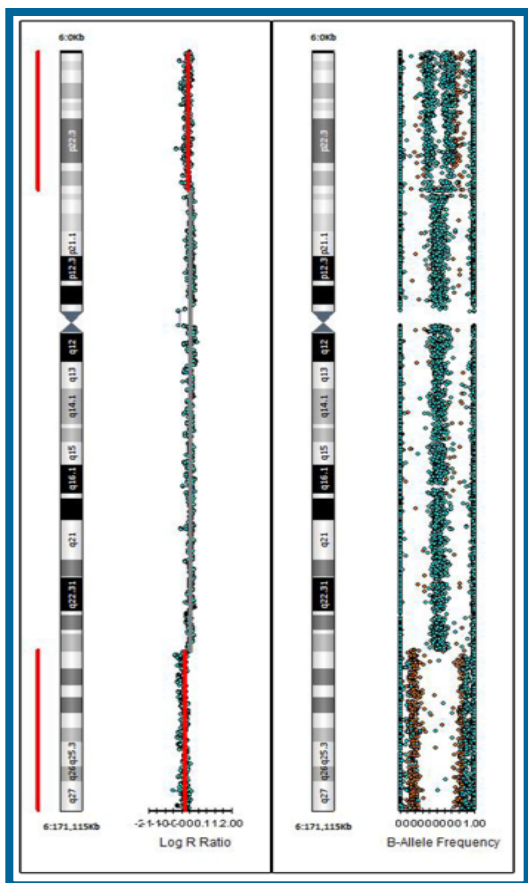
- Předehřáli jsme tepelný blok na 95°C
- Předehřáli jsme hybridizační pec na 48°C
- Do příslušných míst na čipu jsme nanесли 15 µl resuspendované, fragmentované DNA pro každý ze 12 vzorků
- Čip jsme inkubovali v hybridizační peci 18 hodin při 48°C

3. den

1. Příprava čipu na analýzu: odmývání nenahybridizované a nespecificky hybridizované DNA, značení (prodloužení o jednu bázi), amplifikace signálu a skenování

- Vyndali jsme čip z hybridizační pece a nechali vychladnout
- Po sejmutí folie jsme čip promyli 2x 1 minutu vždy v novém PB1 pufru
- K čipu jsme přidali spacer a skleněné sklíčko a vše zafixovali svorkami; tím vznikla mezi celou plochou čipu a protilehlým sklíčkem štěrbina o definované tloušťce, určující rychlost průtoku promývacích roztoků
- Přendali jsme takto zafixovaný čip do vyhřívané (na 44°C) promývací stanice (Illumina, San Diego) a umístili jej do (téměř) svislé polohy; níže uvedené roztoky tedy protékaly kolem čipu působením gravitační síly rychlostí určenou šířkou štěrby a viskozitou roztoků

- Promyli jsme čip 150 μ l roztoku RA1 a poté jsme čip inkubovali 30 vteřin; toto jsme 5x opakovali
- Promyli jsme čip 450 μ l roztoku XC1 a inkubovali 10 minut
- Promyli jsme čip 450 μ l roztoku XC2 a inkubovali 10 minut
- Nanesli jsme na čip 200 μ l roztoku TEM a inkubovali 15 minut. Během této doby došlo k prodloužení jednotlivých sond přesně o jednu bázi (single-base extension), komplementární k bázi daného testovaného SNP na nahybridizovaném vlákně DNA. Prodlužující báze má na sobě navázanou další molekulu, nejčastěji např. biotin či DNP (2, 4-dinitrofenol).
- Promyli jsme čip 450 μ l 95% formamidu s přidavkem 1 mM EDTA a inkubovali 1 minutu. Tento krok byl jednou opakován; poté jsme čip inkubovali 5 minut.
- Spustili jsme proces chlazení promývací stanice, nově nastavená teplota byla 32°C
- Ihned jsme čip promyli 450 μ l XC3 a inkubovali 1 minutu, tento krok byl jednou opakován.
- Poté, co teplota promývací stanice klesla na 32°C, nanesli jsme na čip 250 μ l STM a inkubovali jsme 10 minut
- Promyli jsme čip 450 μ l XC3 a inkubovali jsme 1 minutu. Tento krok byl jednou opakován a poté jsme čip inkubovali 5 minut.
- Nanesli jsme na čip 250 μ l ATM a inkubovali jsme 10 minut
- Promyli jsme čip 450 μ l XC3 a inkubovali jsme 1 minutu. Tento krok byl jednou opakován a poté jsme čip inkubovali 5 minut.
- Opakovali jsme znovu kroky 1 – 4.
- Opakovali jsme krok 1. a 2.
- Vyndali jsme čip z promývací stanice, rozložili (oddělili jsme sklíčko a spacer od vlastního čipu) a promyli jsme čip v pufru PB1 po dobu 5 minut
- Čip jsme ponořili na 5 minut do předem připraveného roztoku XC4 (XC4 zásobní roztok naředěný 350 ml 100% etanolu) a následně sušili zhruba 1 hodinu za mírného podtlaku (tlak cca 0,68 baru). Roztok XC4 vytvořil po zaschnutí na povrchu čipu ochrannou vrstvu.
- Usušený čip byl naskenován pomocí skeneru iScan Microarray Reader



Obr.12. Chromosomové aberace detekované metodou SNP array. Delece 6p, 6q. Obrázek byl exportován z programu Karyostudia (Illumina).

6 Výsledky

Metodou I-FISH a/nebo SNP array vyšetřili jsme celkem 38 vzorků mozkové tkáně získané při neurochirurgických operacích 35 nemocných s histologicky prokázaným mozkovým gliomem diagnostikovaných v letech 2012-2015 SNP array. Jednalo se o 18 žen a 17 mužů ve věku od 20 do 74 let (průměrný věk v době první operace byl 45,5 let; medián 38 let). Tři pacienti byli vyšetřeni opakovaně v době stanovení diagnózy a následně při recidivě tumoru. Na základě histologického nálezu jsme pacienty rozdělili do dvou skupin dle stupně malignity. První skupina zahrnovala 15 nemocných s nízkostupňovými gliomy (WHO stupeň I a II). Jednalo se o 10 mužů a 5 žen (průměrný věk 37,2 let; medián 37 let). Zastoupení jednotlivých subtypů v této skupině bylo: pilocytický astrocytom - grade I (1x), supendymom - grade I (1x), dysplastický gangliocytom - grade I (1x), difúzní astrocytom - grade II (8x), oligodendrogliom - grade grade II (2x), fibrilární astrocytom - grade II (1x) a anaplastický astrocytom - grade grade II (1x). Klinická data nemocných v zařazených této skupině jsou shrnuty v Tab. 2.

Druhá skupina zahrnovala 20 nemocných s vysokostupňovými gliomy (WHO stupeň III a IV). Jednalo se o 7 mužů a 13 žen (průměrný věk 42,2 let; medián 42 let). Do této skupiny jsme zařadili pacienty s diagnózami anaplastický astrocytom - grade III (6x), anaplastický oligoastrocytom - grade III (1x), anaplastický oligodendrogliom - grade III. (1x), primární glioblastom - grade IV (2x) a sekundární glioblastom - grade IV (10x). Klinická data nemocných v zařazených této skupině jsou shrnuta v Tab. 3.

Jako negativní kontrolu pro ověření citlivosti metody I-FISH jsme vyšetřili 9 vzorků nenádorové mozkové tkáně, která byla odebrána v rámci epileptochirurgického programu nebo při jiných chirurgických výkonech. Výsledky I-FISH analýz u kontrolní skupiny jsou shrnuty v Tab. 4.

Metodou SNP array jsme vyšetřili celkem 35 vzorků od 32 pacientů (tři nemocní s opakovanými odběry při recidivě. K vyloučení vrozených variant v počtu DNA sekvencí (CNV) a vrozených uniparentálních disomií (UPD) jsme u všech pacientů srovnali nález SNP array v nádorových buňkách (DNA izolovaná ze vzorků mozkové tkáně) a v nenádorových buňkách (DNA izolovaná z periferní krve). U dvou vzorků (TK 517, TK 518) nebylo k dispozici dostatečné množství materiálu pro izolaci DNA, a proto jsme provedli pouze vyšetření metodou I-FISH.

6.1 Výsledky I-FISH

6.1.1 Skupina I (nizkostupňové gliomy)

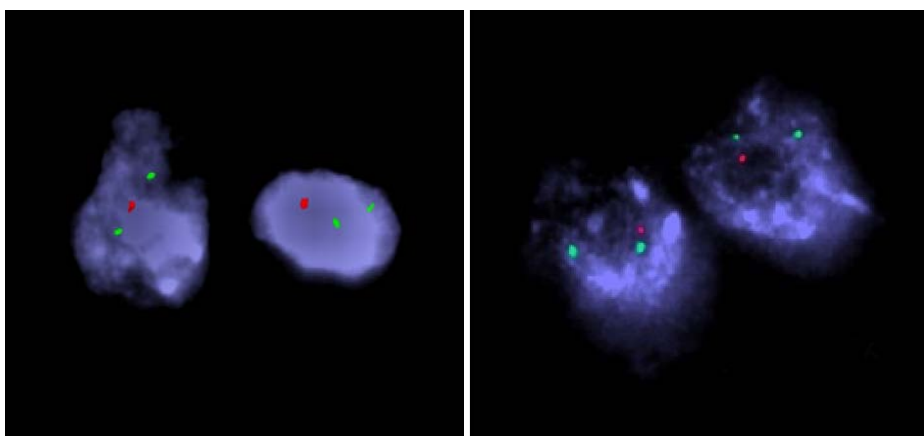
V první skupině, zahrnující nizkostupňové gliomy (stupeň I a II), jsme panelem lokus specifických a centromerických sond pro detekci sedmi nejčastějších aberací vyšetřili 15 nemocných. I-FISH analýza prokázala normální nález u pěti z nich (TK 507, TK 519, TK 530, TK 540, TK 553).

Patologický nález jsme prokázali celkem u 10/15 nemocných (67%). U čtyř z nich jsme prokázali přítomnost polyploidních buněk bez dalších chromosomových aberací (TK 513, TK 515, TK 534, TK 538). Buňky jsme za polyploidní považovali v případě, kdy jsme detekovali tři a více fluorescenčních signálů pro každou z použitých DNA sond. U tří nemocných jsme prokázali přítomnost polyploidních buněk spolu s dalšími chromosomovými aberacemi (TK 517, TK 518, TK 533).

U pěti nemocných (TK 517, TK 523, TK 528, TK 533, TK 548) jsme našli trisomii chromosomu 7 (rozsah patologického klonu 6,5–42%), vyskytující se v časnějších stádiích mozkových tumorů. Jednalo se o nemocné s diagnózou difúzní astrocytom grade II (3x), supendymom grade I (1x) a oligodendrogliom grade II (1x).

U jednoho pacienta s anaplastickým astrocytmem grade II (TK 518) jsme prokázali přítomnost chromosomové aberace typické pro gliomy vyšších stupňů – delecí genu *P16* (9p21), kterou jsme prokázali v 21,5% interfázních jader. U dalšího pacienta s nizkostupňovým oligodendrogliomem grade II (TK 548) jsme v 40% interfázních jader prokázali kombinovanou delecí chromosomů 1p36/19q13, což je nález typický pro anaplastické oligodendrogliomy grade III (Obr. 13). V obou případech došlo později k progresi onemocnění.

U jednoho nemocného TK 528 (supendymom grade I) byla prokázána delecce dlouhých ramen chromosomu 13 nezahrnující gen *RB1*. Jednalo se o delecí oblasti (13)(q34), která byla zachycena v 70% interfázních jader. Výsledky I-FISH ve Skupině I jsou shrnuty v Tab. 2.

A- Vysis LSI 1p36/1q25**B-** Vysis LSI 19p13/19q13

Obr.13. Interfázni jádra s kombinovanou delecí 1p(36)/19q(13) detekovanou metodou I-FISH u pacienta s nízkostupňovým oligodrogliomem grade II (TK 548). Vlevo sonda Vysis LSI 1p36/1q25 - oblast 1p36 značená červeně (Spectrum Orange), kontrolní oblast 1q25 značená zeleně (Spectrum Green). Vpravo sonda Vysis LSI 19p13/19q13 - oblast 19q13 značená červeně (Spectrum Orange), kontrolní oblast 19p13 značená zeleně (Spectrum Green).

	IČ pacienta	Pohlaví	Věk	Diagnóza	Stupeň	Souhrnné výsledky I-FISH	Recidiva
1	TK 507	M	49	difúzní astrocytom	II	normální nález	ano
2	TK 513	Ž	34	difúzní astrocytom	II	polyploidie (14%)	ne
3	TK 515	M	36	oligodendrogliom	II	polyploidie (25%)	ne
4	TK 517	Ž	44	difúzní astrocytom	II	polyploidie (12%), trisomie 7 (6,5%),	ne
5	TK 518	Ž	31	anaplastický astrocytom	II	delece p16 (21,5%), polyploidie (16%)	ano
6	TK 519	M	49	difúzní astrocytom	II	normální nález	ne
7	TK 523	M	20	difúzní astrocytom	II	trisomie 7 (6,5%)	ne
8	TK 528	M	30	supendymom	I	del(13)(q34) (70%), trisomie 7 (42%),	ne
9	TK 530	M	37	dysplastický gangliocytom	I	normální nález	ne
10	TK 533	M	24	difúzní astrocytom	II	trisomie 7 (35%), polyploidie (20%)	ne
11	TK 534	M	37	difúzní astrocytom	II	polyploidie (45%)	ne
12	TK 538-I	M	38	difúzní astrocytom	II	polyploidie (65%)	ano
13	TK 540	Ž	33	pilocytický astrocytom	I	normální nález	ne
14	TK 548	Ž	61	oligodendrogliom	II	delece 1p36/19p13 (40%), trisomie 7 (6,5%)	ano
15	TK 553	Ž	40	fibrilární astrocytom	II	normální nález	ano

IČ = identifikační číslo; TK 538-I = první diagnostický odběr u pacienta TK 538

Tab.2. Výsledky I-FISH ve skupině I (nizkostupňové gliomy)

6.1.2 Skupina II (vysokostupňové gliomy)

Do druhé skupiny jsme zařadili 20 nemocných s vysokostupňovými gliomy (stupeň III a IV). U 4/20 nemocných jsme metodou I-FISH nenalezli žádnou chromosomovou aberaci (TK 510, TK 531, TK 536, TK 549).

Patologický nález jsme potvrdily celkem u 16/20 nemocných (76%). Pouze u třech nemocných jsme prokázali přítomnost polyploidních buněčných klonů bez dalších chromosomových aberací (TK 522, TK 545, TK 547). Ostatní pacienti měli více než jednu chromosomovou aberaci.

Častým nálezem byla trisomie chromosomu 7, kterou jsme prokázali celkem u šesti nemocných (TK 512, TK 514, TK 516, TK 526, TK 537 a TK 564). Velikost patologického klonu se pohybovala od 3,5% do 85% interfázních jader. U jednoho pacienta s primárním glioblastomem jsme v 85% interfázních jader našli kromě trisomie 7 také amplifikaci genu *EGFR* (TK 564) (Obr. 14).

Deleci genu *p16* jsme prokázali u sedmi nemocných. V pěti případech se jednalo o bialelickou deleci (TK 524, TK 526, TK 527, TK 537 a TK 564). U dvou nemocných jsme současně s delecí genu *P16* detekovali ztrátu druhého chromosomu 9 – monosomii 9 (TK 527 a TK 569) a jeden pacient měl monosomii chromosomu 9 (TK 516) bez delece druhé alely genu *P16*.

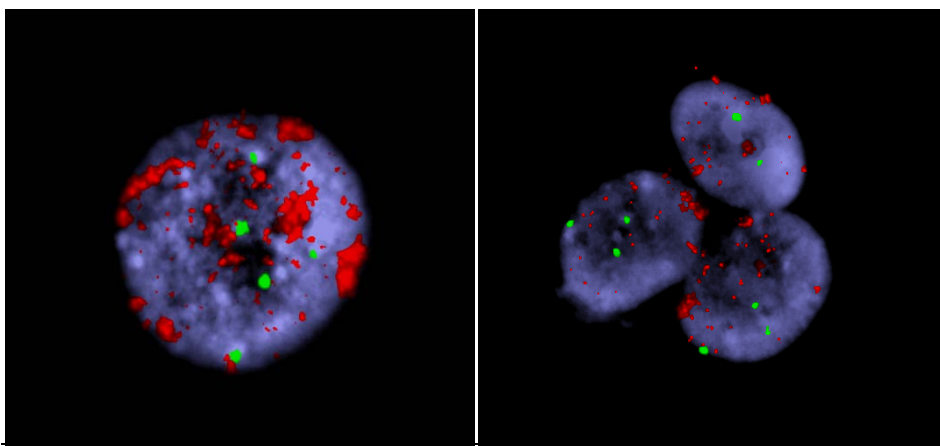
Monosomii chromosomu 10 jsme našli u pěti nemocných s glioblastomem (4x sekundární, 1x primární). Rozsah patologického klonu s monosomií 10 se pohyboval od 10% do 81% interfázních jader (TK 514, TK 516, TK 537, TK 564 a TK 569). U jednoho pacienta s primárním glioblastomem (TK 529) jsme prokázali samostatnou deleci genu *PTEN* (10q23.3) v 9,5% interfázních jader.

U tří pacientů jsme detekovali kombinovanou deleci 1p36 a 19q13 (5% - 17% interfázních jader). Ve dvou případech se jednalo o pacienty s anaplastickým oligodendrogliomem (TK 546 a TK 551). Jeden nemocný měl podle histologické klasifikace anaplastický astrocytom (TK 526). Kromě toho jsme u dvou pacientů se sekundárním glioblastomem prokázali deleci chromosomové oblasti 1p36 buď jako samostatnou změnu

(TK 541) nebo v kombinaci s dalšími aberacemi (TK 514). Rozsah klonu s delecí 1p36 se pohyboval od 24,5% do 66,5% interfázních jader.

Bialelickou delecí genu *RB1* (13q14) jsme zachytili u jednoho pacienta se sekundárním glioblastomem (TK 537) v 45% interfázních jader. Ve vzorku dalšího pacienta se sekundárním glioblastomem (TK 569) jsme v 19,5% jader prokázali delecí chromosomové oblasti 13q34 nezahrnující gen *RB1*. Delecí genu *TP53* (17p13) jsme našli u jednoho pacienta s anaplastickým oligodendrogliomem (TK 551) v 5% interfázních jader. Výsledky I-FISH ve Skupině II jsou shrnuty v Tab. 3.

A, B- Sonda Vysis LSI EGFR/CEP 7



Obr. 14. Nález amplifikace genu *EGFR* detekovaný metodou FISH v interfázních buňkách pacienta s primárním glioblastomem (TK 564). Sonda Vysis LSI EGFR/CEP 7; oblast 7p12 (*EGFR* gen) značená červeně (Spectrum Orange), kontrolní oblast 7p11.1- q11.1 značená zeleně (Spectrum Green).

	IČ pacienta	Pohlaví	Věk	Diagnóza	Stupeň	Souhrnné výsledky I-FISH	Recidiva
1	TK 510	Ž	28	anaplastický astrocytom	III	normální nález	ne
2	TK 512	M	30	glioblastom sekundární	IV.	trisomie 7 (35%), polyploidie (13,6%)	ano
3	TK 514	Ž	71	glioblastom sekundární	IV	trisomie 7 (70%), delece <i>P16</i> (70%), monosomie 10 (69%), delece 1p36 (66,5%)	ne
4	TK 516	M	37	glioblastom sekundární	IV	monosomie 10 (81,5%), trisomie 7 (63%), monosomie 9 (6,5%)	ne
5	TK 522	M	32	glioblastom sekundární	IV.	polyploidie (5%)	ano
6	TK 524	Ž	74	glioblastom sekundární	IV.	bialelická delece <i>P16</i> (42%), polysomie 7 (37%)	ne
7	TK 526-I	Ž	36	anaplastický astrocytom	III	tri-/tetrasomie 7 (14,5%), bialelická delece <i>P16</i> (34%), delece 1p36/19q13 (5-17%), polyploidie (17%)	ano
8	TK 527	Ž	37	glioblastom sekundární	IV.	bialelická delece <i>P16</i> (71%), monosomie 9 (39%)	ano
9	TK 529	Ž	60	glioblastom primární	IV.	polysomie 7 (71,5%), amplifikace <i>EGFR</i> (71%), tetrasomie 17 (60%), trisomie 17 (15%), delece <i>PTEN</i> (9,5%), polyploidie (30%)	ano
10	TK 531	Ž	43	anaplastický astrocytom	III	normální nález	ne
11	TK 536	Ž	46	glioblastom sekundární	IV	normální nález	ano
12	TK 537	M	68	glioblastom sekundární	IV	bialelická delece <i>P16</i> (55%), bialelická delece <i>RB1</i> (45%), trisomie 7 (14%), monosomie 10 (10%)	ne
13	TK 541	Ž	35	glioblastom sekundární	IV	delece 1p36 (24,5%)	ne
14	TK 545	M	34	anaplastický astrocytom	III	polyploidie (12%)	ano
15	TK 546	M	48	anaplastický oligoastrocytom	III	delece 1p36 (7,5%), delece 19q13 (13%)	ano
16	TK 547	Ž	37	anaplastický astrocytom	III	polyploidie (37%)	ne

IČ = identifikační číslo; TK 526-I = první diagnostický odběr u pacienta TK 526

Tab.3. Výsledky I-FISH ve Skupině II (vysokostupňové gliomy) – první část

	IČ pacienta	Pohlaví	Věk	Diagnóza	Stupeň	Souhrnné výsledky I-FISH	Recidiva
17	TK 549-I	Ž	68	anaplastický astrocytom	III	normální nález	ano
18	TK 551	Ž	43	anaplastický oligodendrogliom	III	delece 19q25 (7,5%), delece 1p36 (5%), delece <i>TP53</i> (5%)	ano
19	TK 564	M	41	glioblastom primární	IV	trisomie 7 (85%), amplifikace <i>EGFR</i> (85%), bialelická delece <i>P16</i> (75%), monosomie 10 (84%), tetrasomie 17 (2,5%)	ano
20	TK 569	Ž	71	glioblastom sekundární	IV	monosomie 9 (40%), tetrasomie 7 (30%), monosomie 10 (30%), monosomie 13 (19%), delece <i>P16</i> (8%)	ano

IČ = identifikační číslo; TK 549-I = první diagnostický odběr u pacienta TK 549

Tab.3. Výsledky I-FISH ve Skupině II (vysokostupňové gliomy) - *pokračování*

6.1.3 Výsledky I-FISH analýzy u kontrolní skupiny

Kontrolní skupinu tvořilo devět vzorků nenádorové mozkové tkáně, která byla odebrána při neurochirurgických operacích pacientům s epilepsií. U všech kontrolních vzorků jsme provedli I-FISH analýzu za použití stejného panelu lokus specifických a/nebo centromerických sond a ani v jednom případě jsme nedetekovali žádné chromosomové aberace. Výsledky I-FISH analýz v kontrolní skupině jsou shrnuty v Tab. 7.

	IČ pacienta	Pohlaví	Věk	Výsledky I-FISH
1	16	Ž	43	normální nález
2	19	Ž	32	normální nález
3	21	M	32	normální nález
4	23	M	40	normální nález
5	30	M	50	normální nález
6	99	Ž	73	normální nález
7	129	M	59	normální nález
8	148	Ž	78	normální nález
9	239	M	73	normální nález

Tab.4. Výsledky I-FISH - kontrolní skupina

6.2 Výsledky SNP array

Metodou SNP array jsme vyšetřili celkem 35 vzorků mozkové tkáně získané od 32 pacientů. U dvou nemocných nebylo možné SNP array analýzu provést, protože se nepodařilo získat dostatečné množství materiálu pro izolaci DNA. U těchto pacientů jsme proto provedli pouze vyšetření metodou I-FISH. Pomocí celogenomové analýzy jsme hledali rekurentní nebalancované aberace, při kterých dochází ke ztrátám nebo zisku DNA sekvencí případně ke vzniku získaných UPD. Porovnávali jsme frekvenci těchto změn u nemocných s nízkostupňovými a vysokostupňovými gliomy. Hledali jsme chromosomy a/nebo chromosomové oblasti, na kterých dochází nejčastěji ke vzniku nebalancovaných změn, a hledali jsme významné kandidátní geny lokalizované v těchto oblastech. Opakovaně jsme vyšetřili tři pacienty s recidivujícím a/nebo progredujícím nádorem. Přehled nálezů SNP array v celém souboru nemocných znázorňuje (Obr. 15).

6.2.1 Skupina 1 (nízkostupňové gliomy)

V první skupině jsme vyšetřili 13 pacientů. U dvou vzorků (TK 517, TK 518) nebyla analýza SNP array provedena. U vzorku TK 530 jsme metodou SNP array neprokázali žádné aberace a normální nález potvrdila i metoda I-FISH. Domníváme se, že v tomto případě se nepodařilo správně odebrat nádorovou tkáň.

Nejčastějším nálezem ve skupině nemocných s nízkostupňovými gliomy byla získaná UPD (acquired UPD = AUD) na krátkých ramenech chromosomu 17, kterou jsme detekovali u celkem šesti nemocných (TK 507, TK 513, TK 523, TK533, TK 534, TK 538). U pacienta TK 528 jsme našli aUPD celého chromosomu 17.

Druhým častým nálezem byly aberace chromosomu 6. Ve třech případech šlo o různé velké delece dlouhých ramen chromosomu 6 (TK 507, TK 515, TK 553), z toho u jednoho pacienta byla delece v kombinaci s aUPD 6q. Kromě toho jsme u nemocného TK 528 identifikovali aUPD celého chromosomu 6 a u pacienta TK 534 monosomii chromosomu 6.

U tří pacientů (TK 507, TK 533, TK 553) jsme identifikovali amplifikace dlouhých ramen chromosomu 8, z toho u jednoho nemocného v kombinaci s delecí 8p. Dále u jsme nemocného TK528 detekovali aUPD celého chromosomu 8 a u pacienta TK 534 jsme našli monosomii chromosomu 8.

Ve čtyřech případech (TK 515, TK 528, TK 534, TK 548) jsme detekovali změny krátkých ramen chromosomu 9, konkrétně delece (2x), aUPD9p (1x) a aUPD celého chromosomu 9 (1x).

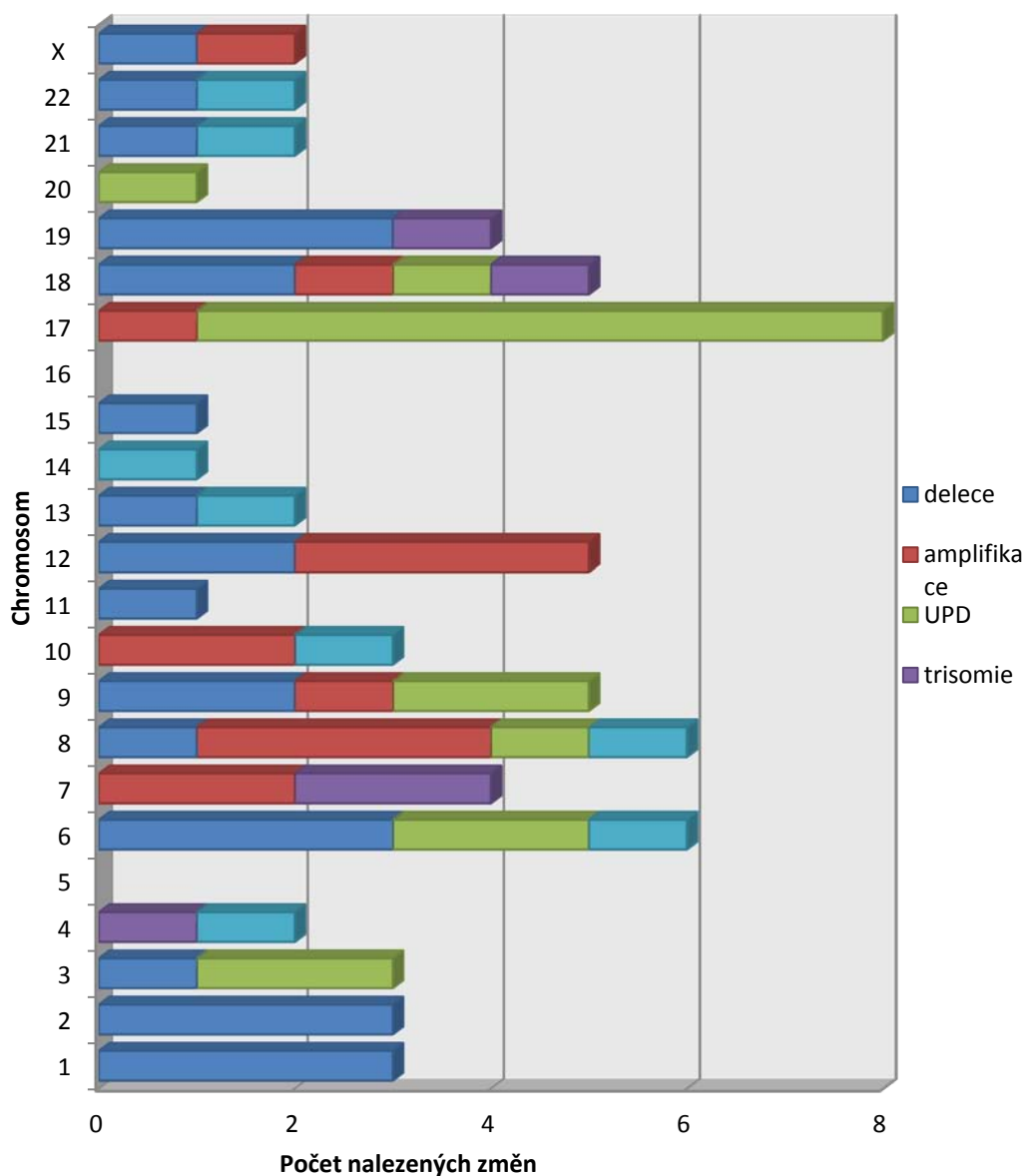
Deleci dlouhých ramen chromosomu 19 jsme našli u tří nemocných (TK 515, TK 538, TK 548).

V celém souboru nebyly pozorovány žádné aberace v chromosomových oblastech 1q, 11q, 15p a na chromosomech 5 a 16. Přehled výsledků SNP array shrnuje Tab. 5 a Graf 2.

	IČ pacienta	Výsledky SNP array
1	TK 507	Arr: del(6)(q16.1qter),add(8)(q21.13qter),UPD(17)(p13.1pter)
2	TK 513	Arr: UPD(17)(p11.2pter),del(21)(q21.1q22.11)(q21.1q22.11)(q22.13q22.2),del(22)(q11.1q11.22)
3	TK 515	Arr: del(2)(q37.3),del(6)(q22.3qter),add(7)(q22.1qter),del(9)(p21.1pter),add(12)(p13.31p13.33)(p13.33pter),del(15)(q26.2qter),add(18)(p11.21pter),del(19)(q12qter)
4	TK 517	nedostatečné množství materiálu, provedena pouze I-FISH
5	TK 518	nedostatečné množství materiálu, provedena pouze I-FISH
6	TK 519	Arr: del(1)(p11.2pter)
7	TK 523	Arr: del(11)(p11.1pter), UDP(17)(p12pter)
8	TK 528	Arr: UPD(3) +4,UPD(6),+7,UPD(8),UPD(9),-13,UPD(17),+18,+19,UPD(20),-21
9	TK 530	normální karyotyp
10	TK 533	Arr: +7,del(8)(p23.2p23.1),add(8)(q24.12q24.3),add(10)(p15.3),add(12)(p12.1pter),UPD(17)(p11.2pter),
11	TK 534	Arr: del(1)(p32.2),-6,add(7)(p11.2q11.21),-8,del(9)(p13.1p21.3)(p21.3pter),-10,add(12)(q13.2q14.1),-14,add(17)(q11.2),UPD(17)(p11.2pter),del(18)(p11.1qter),-22
12	TK 538-I	Arr: del(3)(p11.1p26.3)(q28q29),add(9)(q34.11q34.3),del(12)(q11.1q22)(q23.1)(q24.11q24.13),UPD(17)(p14.1p22.3),del(13)(q14.2q14.3)(q21.2q21.3)(q21.32q21.33),del(19)(q13.31q13.43)
13	TK 540	Arr: del(12)(q15q22.1)
14	TK 548	Arr: del(1)(p11.2pter),del(2)(q37.3qter),-4,UPD(9)(p13.1pter),del(19)(q11qter)
15	TK 553	Arr: del(X)(p11.22pter)(q23q27.3)(q27.3qter),add(X)(q23),del(2)(p22.1pter)(q31)(q35q36.1)(q36.3qter),UPD(3)(p21.31pter),del(6)(q21.1q24.3),UPD(6)(q24.3qter),add(8)(q21.11q21.13)(q21.13qter),add(10)(p15.3pter),del(18)(q11.2q12.1)(q12.1q12.2)(q12.3)(q21.32q22.1)(q22.1q23.1),UPD(18)(p11.21pter)

IČ = identifikační číslo

Tab.5. Výsledky SNP array ve Skupině 1 (nízkostupňové gliomy)



Graf 2. Přehled nebalancovaných změn na jednotlivých chromosomech detekovaných metodou SNP array u nemocných s nízkostupňovými gliomy.

6.2.2 Skupina 2 (vysokostupňové gliomy)

Ve druhé skupině jsme vyšetřili 19 pacientů. U vzorku TK 546 nebyla SNP array provedena.

Nejčastějším nálezem u vysokostupňových gliomů byly nebalancované aberace krátkých ramen chromosomu 9. V deseti případech (TK 512, TK 514, TK 522, TK 524, TK

526, TK 537, TK545, 547, TK 549, TK564) jsme prokázali delecí 9p. Kromě toho jsme u dvou pacientů (TK 527, TK 569) našli monosomii chromosomu 9.

Celkem v jedenácti případech jsme prokázali změny na chromosomu 10. Monosomii chromosomu 10 jsme zaznamenali celkem u sedmi pacientů (TK 514, TK 516, TK 524, TK 529, TK 549, TK 564, TK 569). Dále jsme u jednoho nemocného detekovali aUPD celého chromosomu 10 (TK 537). Kromě toho jsme detekovaly u dvou nemocných ztráty genetického materiálu v oblasti dlouhých ramen chromosomu 10 (TK 526, TK 545).

Častým nálezem byla rovněž trisomie chromosomu 7. Tuto aberaci jsme prokázali celkem u pěti nemocných (TK 512, TK 514, TK 516, TK 564, TK 569).

Dalším rekurentním nálezem byla aUPD krátkých ramen chromosomu 17 detekovaná u pěti nemocných (TK 510, TK 526, TK 531, TK 545, TK 547) a/nebo aUPD celého chromosomu 17 nalezená u dvou pacientů (TK 529, TK 536).

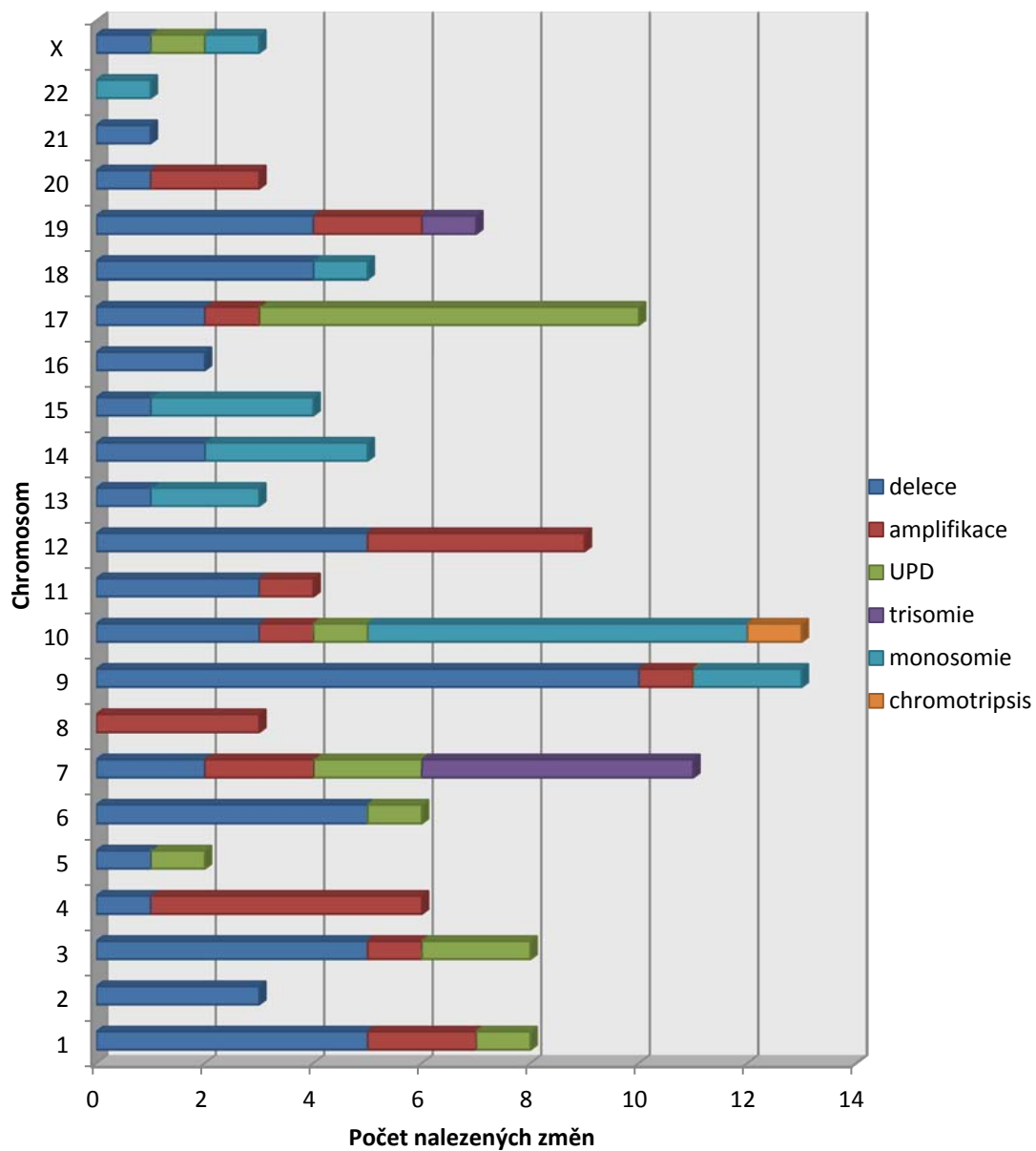
Přehled nálezů SNP array u nemocných s vysokostupňovými gliomy shrnuje Tab. 6 a Graf 3.

	IČ pacient a	Výsledky SNP array
1	TK 510	Arr: del(3)(q28qter),add(8)(q21.2q24.3),UDP(17)(p13.1pter)
2	TK 512	Arr: +7,del(9)(p21.3)
3	TK 514	Arr: del(1)(p36.22pter)(p32.3)(p31.1q21.1),add(1)(q32.1),+7,del(9)(p21.3),-10,del(12)(q21.32)(q21.32q22),del(17)(q11.q21.2),-22
4	TK 516	Arr: add(4)(q12),+7,-10,del(12)(q12)(q14.3q15)(q15q21.1),add(12)(q12)(q13.3q14.1)(q15),-15
5	TK 522	Arr: del(3)(p12.1),del(9)(p12pter),del(11)(p11.12)(p12p13)(p14.1p14.3)(p15.2p15.5)(q12.1q13.1),(q13.2q13.4)(q14.1q14.2)(q21q23.3)(q24.1)(q24.3),del(12)(p13.1p13.31)(q11q12),del(13)(q12.3q13.2),del(14)(q11.2)(q12q13.1)(q13.3q21.1)
6	TK 524	Arr: del(6)(q11.1qter),del(9)(p24.2pter)(p24.2p13.1),-10,-14,del(17)(q11.2)
7	TK 526-I	Arr: del(4)(q28.3q31.21),del(5)(p15.33pter)(q23.3q31.2)(q33.3qter),del(6)(p21.32pter)(q23.2qter),del(7)(p22.1pter),add(7)(q22.1qter),del(9)(p12pter)biall(p21.2p21.3),del(10)(q24.33q25.1),UDP(17)(p11.2pter),add(19)(p13.3pter)
8	TK 527	Arr: del(2)(q36.3q37)(q37.1qter),del(6)(q14.3q27)(q27),-9,-18

9	TK 529	Arr: del(2)(p14),add(3)(q27.1q27.3),add(4)(q11q13.1),add(7)(p11.2),UPD(7)(p12.1p22.3)(p11.2q36.3),add(8)(q24.21q24.22)(q24.22q24.23),-10,UPD(17),add(20)(q13.31)
10	TK 531	Arr: add(10)(p11.1p11.21)(p11.22p12)(p12.1p13),UPD(17)(p11.2p13.3),del(21)(q21.1q21.1)
11	TK 536	Arr: del(1)(p11.1p36.3),del(9)(q21.11q33.3)(q33.3q34.3),-11,-15,UPD(17),del(19)(q13.11q13.43)
12	TK 537	Arr: del(3)(p26.3q26.2)(q28q29),UPD(3)(q26.2q27.3)(q28)(q29),del(9)(p21.2p21.3),del(10)(q23.2),UPD(10),del(11)(p11.2)(q12.3q13.1)(q13.2q13.3),del(12)(q21.31q21.32),-13,del(16)(p11.2p11.1)(p11.2p12.2)(p12.3)(q11.2q24.3),del(18)(p11.21p11.32)
13	TK 541	Arr: del(1)(p36.33p36.22),add(1)(q21.1qter),add(4)(q12),add(8)(q21.12q24.3),add(9)(q21.32qter),del(17)(q11.2),add(17)(q11.2qter)
14	TK 545	Arr: del(7)(q31.2q32.1),del(9)(p21.1pter),del(10)(q22.3q24.3),cth(10)(q24.3qter),del(11)(p11.2pter),del(12)(p11.1q13.13),add(12)(p11.1pter),UPD(17)(pterp12),del(18)(q21.2)(q22.)(q22.3)(q23qter),del(19)(q13.2qter)
15	TK 546	nedostatečné množství materiálu, provedena pouze I-FISH
16	TK 547	Arr: del(X)(p22.2pter)(q13.2q21.33)(q24qter),UPD(X)(p22.12p21.3)(p11.4p11.22)(q21.33q24),UPD(1)(p11.1pter),del(2)(q24.2qter),del(3)(q21.1q21.3),UPD(3)(p11.1q21.1)(q21.3q29),UPD(5)(q11.1qter),UPD(6)(q11.1qter),UPD(7)(p14.3pter),del(9)(p13.1pter)(q21.2)(q31.3q33.3)(q34.13qter),UPD(9)(q21.11q21.2)(q21.2q31.3)(q33.3q34.13),add(12)(q22q24.31),UPD(17)(p11.2pter),del(18)(q23.3qter)
17	TK 549-I	Arr: del(1)(p36.32p36.13),add(4)(q12q13.1),del(9)(p13.1pter),-10,-14,-15,del(16)(q12.1q21),del(18)(p11.21pter),del(19)(q13.2q13.33)
18	TK 551	Arr: del(1)(p11.1pter),del(3)(p11.1p22.2),add(11)(q12.3qter),del(14)(q21.3q24.3),del(15)(q12qter),del(19)(q11qter)
19	TK 564	Arr: del(6)(q25.3q27),+7,del(9)(p21.3p21.1),-10,+19,del(20)(q12),add(20)(q12pter)(q12qter)
20	TK 569	Arr: -X,add(4)(q12),del(6)(p11.2q13)(q14.1q27),+7,-9,-10,add(12)(p11.1pter)(q13.12q14.1),-13,-14,add(19)(p13.2pter)

IC = identifikační číslo

Tab. 6 Výsledky SNP array ve Skupině 2 (vysokostupňové gliomy)



Graf 3. Přehled nebalancovaných změn na jednotlivých chromosomech detekovaných metodou SNP array u nemocných s vysokostupňovými gliomy.

6.3 Opakované odběry

U tří pacientů jsme provedli opakovaná vyšetření při recidivě a/nebo k progresi onemocnění. U prvního pacienta s anaplastickým astrocytmem grade II, došlo (TK 526) došlo k recidivě stejného nádoru.

Metodou I-FISH jsme v diagnostickém i opakovaném odběru našli stejné aberace a shodná byla i histologická klasifikace (nedošlo k progresi do vyššího stupně malignity). U dalších dvou pacientů došlo k progresi původního nádoru do vyššího gradu. V jednom případě se jednalo o difúzní astrocytom grade II, který progradoval do anaplastického astrocytomy grade III (TK 538). Ve druhém případě došlo k progresi anaplastického astrocytomy grade III do sekundárního glioblastomy grade IV (TK 549). Metodou I-FISH jsme u obou těchto pacientů prokázali při progresi nádoru získ chromosomových nových aberací, které se v předchozím odběru nevyskytovaly. V obou případech se jednalo o delecí genu *RB1* v 5% a 13% jader a trisomii chromosomu 7 v 6% a 10% interfázních jader.

	IČ pacienta	Pohlaví	Věk	Diagnóza	Stupeň	Souhrnné výsledky I-FISH
1	TK 526-I	Ž	36	anaplastický astrocytom	III	tri-/tetrasomie 7 (14,5%), bialelická delecce <i>P16</i> (34%), delecce 1p36/19q13 (5-17%), polyploidie (17%)
1	TK 526-II	Ž	37	anaplastický astrocytom	III	trisomie 7 (5%), bialelická delecce <i>P16</i> (20%), delecce 1p/19q (20%)
2	TK 538-I	M	38	difúzní astrocytom	II	polyploidie (65%)
2	TK 538-II	M	39	anaplastický astrocytom	III	delecce <i>RB1</i> (5%), trisomie 7 (6%)
3	TK 549-I	Ž	68	anaplastický astrocytom	III	normální nález
3	TK 549-II	Ž	69	glioblastom sekundární	IV	delecce <i>RB1</i> (13%), trisomie 7(10%)

IČ = identifikační číslo; tučně zvýrazněny nově získané aberace

Tab.7. Srovnání výsledků I-FISH u nemocných s opakovanými odběry

Metodou SNP array jsme u všech tří pacientů ve druhém vzorku odebraném při relapsu onemocnění identifikovali nové chromosomové aberace. U pacienta TK 538 jsme nově zaznamenali delece 8q, 10q, 12q a amplifikace 10p, 13q a 19p. Ve druhém případě (TK 526) jsme prokázali nové delece chromosomových oblastí 11p, 13q, 14q a 18q. U třetího nemocného (TK549) jsme zaznamenali novou delecí na dlouhých ramenech chromosomu 13 zahrnující gen *RB1*. (Tab. 10)

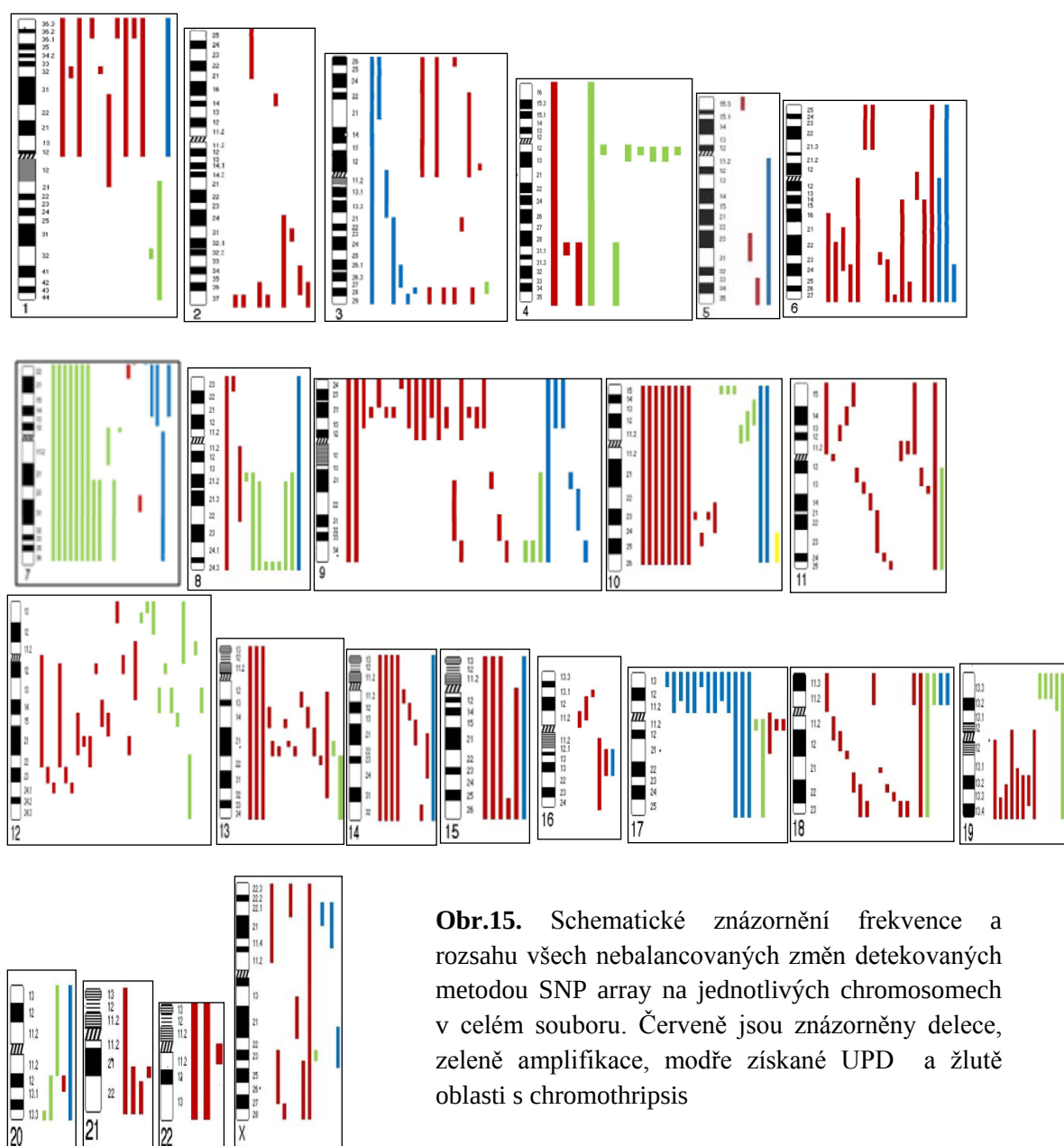
IČ pacienta	Výsledky SNP array
TK 538-I	Arr: del(3)(p11.1p26.3)(q28q29),add(9)(q34.11q34.3),del(12)(q11.1q22)(q23.1)(q24.11q24.13),UPD(17)(p14.1p22.3),del(13)(q14.2q14.3)(q21.2q21.3)(q21.32q21.33),del(19)(q13.31q13.43)
TK 538-II	Arr: del(3)(p11.1p26.3)(q28q29), UPD(7)(p14.1p22.3) , del(8)(q11.1q22.3) , add(9)(q34.11q34.3), add(10)(p15.3pter) , del(10)(q23.1) , del(12)(q12q22)(q23.1q23.2)(q24.11q24.13), del(13)(q14.3)(q21.31)(q21.33), add(13)(q21.2q21.31)(q21.33qter) , del(19)(q13.31q13.43), add(19)(p13.3pter)
TK 526-I	Arr: del(4)(q28.3q31.21),del(5)(p15.33pter)(q23.3q31.2)(q33.3qter),del(6)(p21.32pter)(q23.2qter),del(7)(p22.1pter),add(7)(q22.1qter),del(9)(p12pter)biall(p21.2p21.3),del(10)(q24.3q25.1),UDP(17)(p11.2pter),add(19)(p13.3pter)
TK 526-II	Arr: del(4)(q28.3qter), del(5)(p15.33pter)(q23.3q31.2)(q33.3qter), del(6)(p21.33pter)(q23.1q23.2)(q23.2qter), del(7)(p22.1pter), add(7)(q22.1qter), del(9)(p12pter)biall(p21.2p21.3), del(10)(q24.3q25.1), del(11)(p11.2p11.12) , del(13)(q14.2q14.3)(q14.3q21.1)(q21.32q21.33) , del(14)(q32.2q32.12) , UPD(17)(p11.2pter), del(18)(q23pter??) , add(19)(p13.3pter)
TK 549-I	Arr: del(1)(p36.32p36.13),add(4)(q12q13.1),del(9)(p13.1pter),-10,-14,-15,del(16)(q12.1q21),del(18)(p11.21pter),del(19)(q13.2q13.33)
TK 549-II	Arr: del(1)(p36.32p36.13), add(4)(q12q13.1), del(9)(p13.1pter), -10, del(13)(q12.3q32.1) , -14, -15, del(16)(q12.1q21), del(18)(p11.21pter),del(19)(q13.2q13.33)

IČ = identifikační číslo; tučně jsou zvýrazněny nově zachycené aberace

Tab.8. Srovnání výsledků SNP array u nemocných s opakovanými odběry.

6.4 Analýza rozsahu a typu nebalancovaných změn na chromosomech detekovaných metodou SNP array

Vybrali jsme celkem šest chromosomů, u kterých jsme metodou SNP array nejčastěji zaznamenali změny, a/nebo předpokládali roli v patogenezi nádoru. U každého chromosomu jsme definovali minimální společnou oblast rekurentních aberací a určili specifické geny, které se v dané oblasti vyskytují. Za minimální společnou oblast jsme považovali úsek chromosomu, jehož aberaci vykazovaly všechny vzorky nesoucí danou změnu.



Obr.15. Schematické znázornění frekvence a rozsahu všech nebalancovaných změn detekovaných metodou SNP array na jednotlivých chromosomech v celém souboru. Červeně jsou znázorněny delecce, zeleně amplifikace, modře získané UPD a žlutě oblasti s chromothripsis

6.4.1 Chromosom 1

Nejčastější rekurentními nebalancovanými změnami, které jsme na chromosomu 1 zaznamenali, byly delece v oblasti krátkých ramen. Ve čtyřech případech se jednalo o deleci celých krátkých ramen (1×difúzní astrocytom, 1×oligodendrogliom, 1×anaplastický oligodendrogliom, 1×sekundární glioblastom). Ve třech případech se jednalo pouze o deleci terminální části krátkých ramen (1×difúzní astrocytom, 1×anaplastický astrocytom, 1×sekundární glioblastom). U pacienta s anaplastickým astrocytmem došlo k progresi do sekundárního glioblastomu a terminální deleci stejného rozsahu jsme zachytili i v dalším vyšetření.

Dále jsem zaznamenali ve dvou případech amplifikaci v oblasti dlouhých ramen (2×sekundární glioblastom). U obou případů byla tato změna detekována v kombinaci s delecí terminální části krátkých ramen chromosomu. Minimální oblast amplifikace dlouhých ramen zahrnovala úsek q32.1. V této oblasti je lokalizováno několik genů, které by mohly hrát roli ve vzniku a progresi gliomů.

Zkratka genu	Název	Typ aberace
<i>IL 10, 19, 20, 24</i>	Interleukin 10, 19, 20, 24	amplifikace
<i>RASSF5</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5/ NORE1	amplifikace
<i>SLC45A3</i>	Solute carrier family 45	amplifikace
<i>ELK4</i>	SRF accessory protein 1	amplifikace
<i>NR5A2</i>	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	amplifikace
<i>RAB29</i>	RAS oncogene family	amplifikace
<i>NUCKS1</i>	Nuclear casein kinase and cyclin- dependent kinase substrate 1	amplifikace
<i>KLF5</i>	Kruppel-like factor 5	amplifikace

Tab.9. Kandidátní geny v minimálních společných oblastech aberací na chromosomu 1.



Obr.15. Chromosom 1- SNP array. Rozsah nebalancovaných změn na chromosomu 1 detekovaných metodou SNP array. Červeně jsou znázorněny delece, zeleně amplifikace a modře UPD.

6.4.2 Chromosom 7

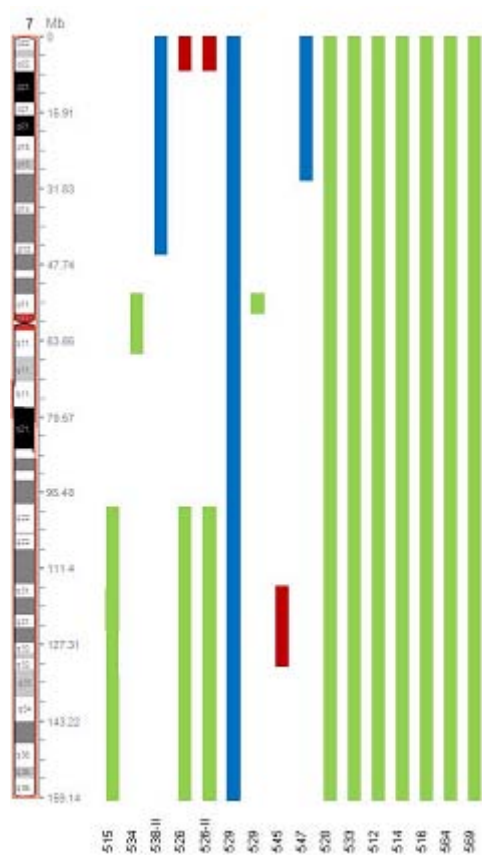
Nejčastější aberací na chromosomu 7 byla trisomie detekovaná v sedmi případech (1×difúzní astrocytom, 1×supendymom, 1×primární glioblastom, 4×sekundární glioblastom). V oblasti dlouhých ramen jsme detekovali také amplifikace ve dvou případech (oligodendrogliom, anaplastický astrocytom). U pacienta s anaplastickým astrocytomech došlo k recidivě stejného nádoru a amplifikace byla nalezena i v dalším vyšetření. Dále jsme zaznamenali amplifikace krátkých ramen ve dvou případech (1×difúzní astrocytom, 1×primární glioblastom). Minimální společnou amplifikovanou oblast zahrnující amplifikaci krátkých ramen a trisomii představoval chromosomový pruh p11.2.

Další změnou postihující krátká ramena byla aUDP nalezená celkem třikrát (2×anaplastický astrocytom, 1×primární glioblastom). Minimální oblast UPD zahrnovala úsek p14.3pter.

V těchto minimálních oblastech aberací jsou lokalizovány kromě genu *EGFR* i další geny, jejichž role v patogenezi nádorů je diskutována.

Zkratka genu	Název	Typ aberace
<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor	amplifikace
<i>IKZF1</i>	Ikaros family zinc finger 1	amplifikace
<i>GRB10</i>	Growth factor receptor-bound protein 10	amplifikace
<i>TRG</i>	T- cell receptor gamma locus	UPD
<i>MAD1L1</i>	MAD1 mitotic arrest deficient-like 1	UPD

Tab.10. Kandidátní geny v minimálních společných oblastech aberací na chromosomu 7.



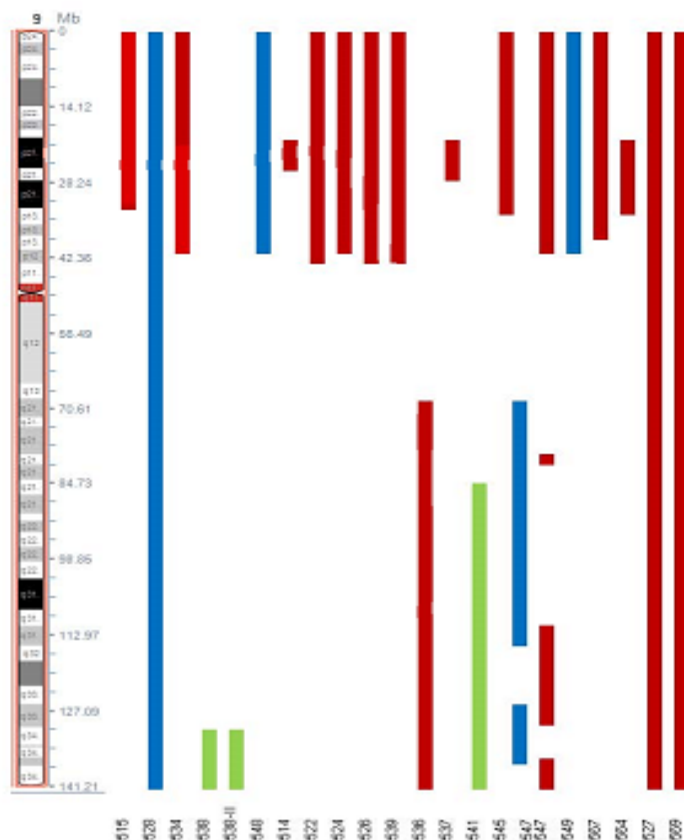
Obr.16. Chromosom 7- SNP array. Zastoupení jednotlivých nebalancovaných změn u pacientů. Červeně znázorněny delecce, zeleně znázorněny amplifikace, modře znázorněny UPD.

6.4.3 Chromosom 9

Chromosom 9 vykazoval delece, amplifikace u aUPD. Nejčastěji jsme detekovaly delece krátkých ramen nalezené ve dvanácti případech (1×difúzní astrocytom, 1×oligodendrogliom, 4×anaplastický astrocytom, 1×primární glioblastom, 5×sekundární glioblastom). U dvou pacientů s anaplastickým astrocytmem došlo k progresi/recidivě. Minimální společná oblast delece krátkých ramen zahrnovala úsek p21.3. Další aberace zahrnovaly aUDP krátkých ramen ve třech případech (1×oligodendrogliom, 1×supendymom, 1×anaplastický astrocytom). Minimální oblast UPD byla definována v úseku p13.1p24.3. Amplifikace dlouhých byla detekována ve dvou případech (1×difúzní astrocytom, 1×sekundární glioblastom). U pacienta s difúzním astrocytmem došlo k progresi do anaplastického astrocytomu. V těchto minimálních společných oblastech jsme vybrali několik kandidátních genů.

Zkratka genu	Název	Typ aberace
<i>Pax5</i>	Paired box 5	aUPD
<i>DOCK8</i>	Dedicator of cytokinesis 8	aUPD
<i>DMRT1</i>	Double sex and mab-3 related transcription factor 1	aUPD
<i>NOTCH1</i>	Notch 1	amplifikace
<i>CARD9</i>	Caspase recruitment domain family, member 9	amplifikace
<i>CDK2NA</i>	Cyclin-dependentkinase inhibitor 2A	delece
<i>DMRTA1</i>	DMRT-likefamily A1	delece
<i>IFNE</i>	Interferon, epsilon	delece

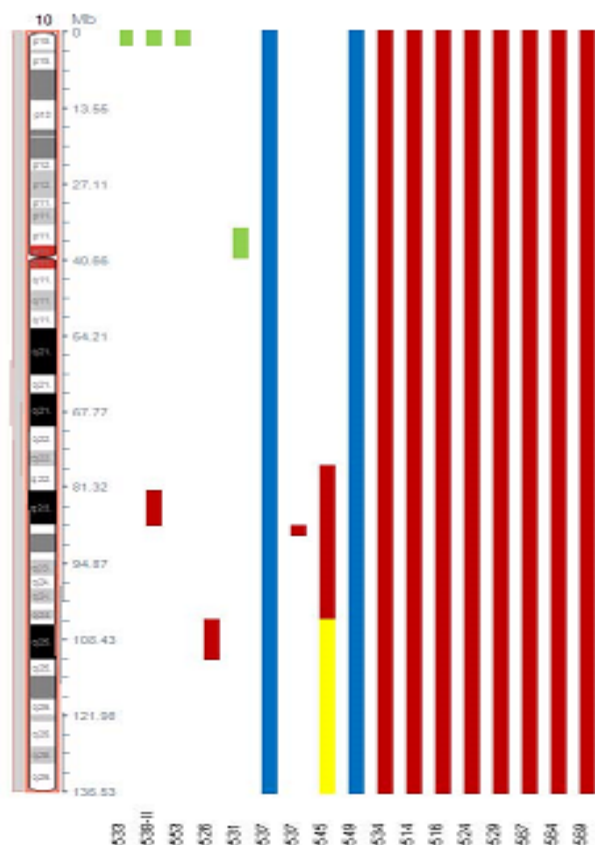
Tab.11. Kandidátní geny v minimálních společných oblastech aberací na chromosomu 9.



Obr.17. Chromosom 9 - SNP array. Zastoupení jednotlivých nebalancovaných změn u pacientů. Červeně znázorněny delecce, zeleně znázorněny amplifikace, modře znázorněny UPD.

6.4.4 Chromosom 10

Nejčastější aberace na chromosomu 10 představovaly monosomie a delecce dlouhých ramen. Jednalo se o 8 monosomií (1×difúzní astrocytom, 1×anaplastický astrocytom, 2×primární glioblastom 4× sekundární glioblastom). U pacienta s anaplastickým astrocytome došlo k progresi do sekundárního glioblastomu. Dále se jednalo o čtyři delecce v oblasti dlouhých ramen (3×anaplastický astrocytom, 1×sekundární glioblastom). U dvou pacientů s anaplastickým astrocytome došlo k progresi/recidivě, u třetího jsme detekovali více menších delecí v oblasti dlouhých ramen. Předpokládáme, že se jedná o chromothripsis.



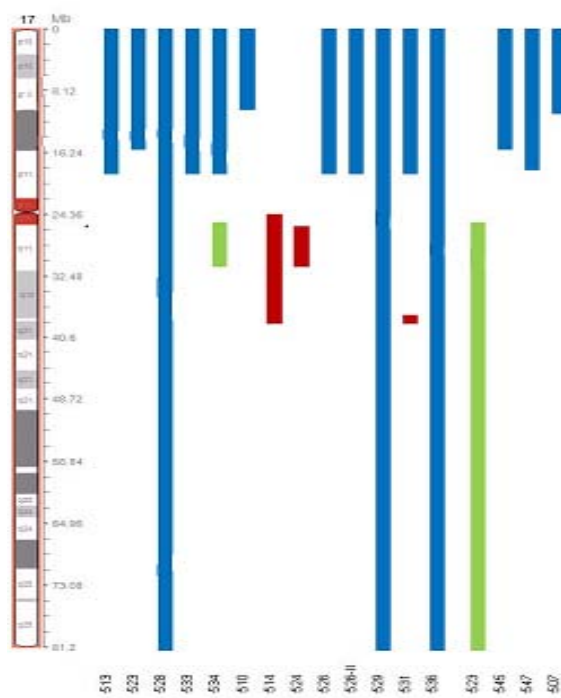
Obr.18. Chromosom 10 - SNP array. Zastoupení jednotlivých nebalancovaných změn u pacientů. Červeně znázorněny delecce, zeleně znázorněny amplifikace, modře znázorněny UPD.

6.4.5 Chromosom 17

Podrobnější analýza chromosomu 17 detekovala nejčastější aUPD v karyotypu nemocných. Jednalo se o aUPD v oblasti krátkých ramen, která byla zachycena v deseti případech (6×difúzní astrocytom, 4×anaplastický astrocytom). U pacienta s anaplastickým astrocytomech došlo k recidivě nádoru a aberace byla detekována i v druhém odběru. Minimální společná oblast s aUPD zahrnovala úsek 13.1p13.3. V této oblasti jsou lokalizovány geny, které hrají roli v buněčných pochodech a předpokládá se, že jejich aberace souvisejí s malignitou buňky.

Zkratka genu	Název	Typ aberace
<i>TP53</i>	Tumor protein p53	aUPD
<i>POLR2A</i>	Polymerase II polypeptide A	aUPD
<i>AURKB</i>	Aurora kinase B	aUPD
<i>TNFSF13</i>	Notch 1 Tumor necrosis factor superfamily, member 13	aUPD
<i>HIC1</i>	Hypermethylated in cancer 1	aUPD

Tab.12. Kandidátní geny v minimálních společných oblastech aberací na chromosomu 17.



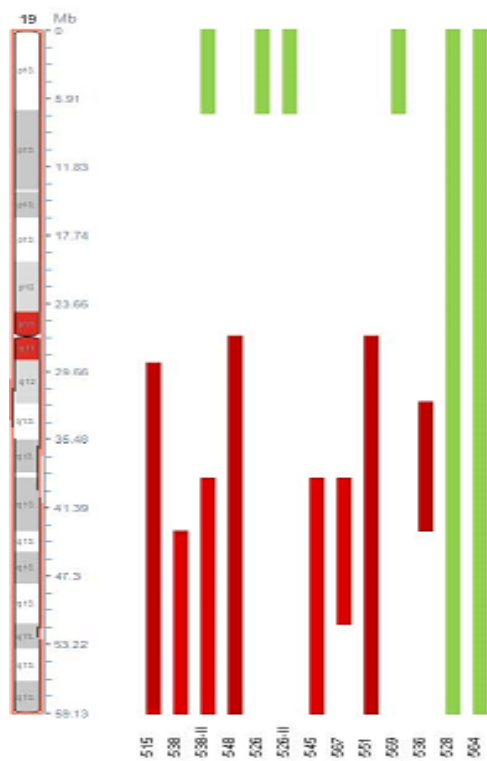
Obr.19. Chromosom 17 - SNP array. Zastoupení jednotlivých nebalancovaných změn u pacientů. Červeně znázorněny delecce, zeleně znázorněny amplifikace, modře znázorněny UPD.

6.4.6 Chromosom 19

Nejčastějšími změnami na chromosomu 19 byly delece v oblasti dlouhých ramen detekované v sedmi případech. Jednalo se tři delece celých ramen (2×oligodendrogliom, 1×anaplastický oligodendrogliom) a čtyři delece zasahující určité oblasti krátkých ramen (1×difúzní astrocytom, 3× anaplastický astrocytom). U dvou pacientů s difúzním astrocytome a anaplastickým astrocytome došlo k progresi nádoru a aberace byly zachyceny i v dalším vyšetření. Minimální společná oblast všech delecí zahrnovala úsek q13.11q13.33. Zisky genetického materiálu jsme detekovali v šesti případech. Jednalo se o tři terminální amplifikace (1×difúzní astrocytom, 2× anaplastický astrocytom) a dvě trisomie. Tyto zisky vykazovaly minimální společnou oblast v úseku p13.3. V oblastech jsme popsali několik genů, u kterých předpokládáme roli v patogenezi gliomů.

Zkratka genu	Název	Typ aberace
<i>STK11</i>	Serine/threoninekinase 11	aUPD
<i>TCF3</i>	Transcription factor 3	aUPD
<i>RPL18</i>	Ribosomal protein L18	aUPD
<i>CCNE1</i>	Cyclin E1	aUPD
<i>FGF21</i>	Fibroblast growthfactor 21	aUPD

Tab.13. Kandidátní geny v minimálních společných oblastech aberací na chromosomu 19.



7 Diskuze

Významnou roli při vzniku a progresi mozkových gliomů hrají chromosomové změny v genomu gliálních buněk. Následkem těchto změn dochází k deregulaci buněčných pochodů a vzniku patologického stavu buňky. Do současné doby byla popsána řada genetických a epigenetických změn, onkogenů a tumor supresorových genů, které se podílejí na patogenezi mozkových gliomů. Hledání nových rekurentních aberací a dalších kandidátních genů, může přispět k lepšímu porozumění některých kroků při vzniku a progresi gliomů a zacílení vhodné léčby, která by vedla ke snížení mortality nemocných.

Do naší studie bylo zařazeno 35 pacientů, u kterých byla histologickým vyšetřením potvrzena diagnóza mozkových gliomů. Nádorové buňky získané při neurochirurgických operacích pacientů s různými subtypy mozkových nádorů jsme vyšetřili metodou I-FISH. Ve všech případech jsme použili stejný panel i lokus specifických a/nebo centromerických sond a sledovali jsme frekvenci známých aberací charakteristických pro nízkostupňové i vysokostupňové gliomy. U všech nemocných jsme dále provedli celogenomovou analýzu pomocí mikročipové metody SNP array. Touto metodou jsme detekovali kryptické nebalancované změny v genomu nádorových buněk a oblasti se získanou UPD. Zaměřili jsme se na rekurentní změny u jednotlivých chromosomů a hledání pravděpodobných kauzálních genů lokalizovaných v těchto oblastech.

U skupiny nízkostupňových gliomů jsme oběma metodami prokázali celkově relativně nízký výskyt chromosomových aberací. V souladu s literaturou tak můžeme potvrdit výsledky dosud publikovaných studií, které popisují nižší frekvenci nálezů u nízkostupňových gliomů, spojenou s méně agresivním průběhem onemocnění (Louis *et al.* 2007). Celkem u 5/15 nemocných ve skupině nízkostupňových gliomů jsme při vyšetření metodou I-FISH nenalezli žádnou ze sledovaných chromosomových změn. Celogenomová analýza metodou SNP array poskytla informace o kryptických genetických změnách mimo dosah I-FISH a upřesnila tak nálezy u většiny těchto nemocných. Normální nález, tj. karyotyp bez výskytu nebalancovaných změn a oblastí s UPD, byl kombinací metod I-FISH a SNP array potvrzen pouze u jednoho pacienta (TK530). U tohoto nemocného se pravděpodobně nepodařilo správně odebrat nádorovou tkáň a vyšetřovaný vzorek tak obsahoval pouze normální mozkové buňky.

U čtyř pacientů s nízkostupňovými gliomy jsme detekovali polyploidní buněčné klony bez dalších chromosomových aberací. U tří nemocných z této skupiny jsme kromě polyploidních buněk identifikovali i další změny karyotypu. Polyploidie je obecně častý a nespecifický nález u solidních tumorů, který vzniká jako důsledek nekontrolovatelného dělení buňky a selhání reparačních mechanismů v nádorových buňkách (Sandberg *et al.* 1963).

U pěti nemocných s nízkostupňovými gliomy jsme prokázali trisomii chromosomu 7. Tato aberace se vyskytuje v časnějším stádiu onemocnění a pravděpodobně patří k raným událostem vedoucím ke vzniku tumoru (Marko *et al.* 2013).

Podle některých autorů je trisomie chromosomu 7 častou aberací, kterou vykazují nemocní s difúzními astrocytomy (Holland *et al.* 2010). Přítomnost nadpočetné kopie chromosomu 7 je spojována s horší prognózou a progresí choroby do vyšších maligních stupňů (Reifenberger *et al.* 2004). Maligní potenciál této aberace pravděpodobně souvisí se zvýšením dávky některých onkogenů, včetně například genu *EGFR*. V naší studii došlo k progresi onemocnění u jednoho pacienta s trisomií chromosomu 7, který zároveň vykazoval kombinovanou delecí 1p36/19q13.

U dvou pacientů s histologicky diagnostikovanými nízkostupňovými oligodendrogliomy jsme předpokládali na základě dosavadních studií (Lhotská *et al.* 2014) nález kombinované delecce 1p36/19q13, který je u tohoto typu gliomu nejčastěji popisovanou aberací (Louis *et al.* 2007). Podle údajů v literatuře je výskyt kombinované delecce 1p36/19q13 u nemocných s oligodendrogliomy dobrým prognostickým faktorem. Tito pacienti dobře reagují na chemoterapeutickou léčbu (Cairncross *et al.* 1998). Metodou I-FISH jsme tuto změnu potvrdili pouze u jednoho z těchto nemocných s a to v kombinaci s trisomií 7 (viz. výše). V průběhu sledování u pacienta došlo k recidivě a progresi nádoru. Asociace dalších aberací u pacientů s kombinovanou delecí 1p36/19q13 s horší prognózou popsali ve studii Zemanová a kol. (2006). Proto předpokládáme, že i v tomto případě hrála trisomie 7 důležitou roli při progresi nízkostupňového oligodendrogliomu do nádoru vyššího stupně.

Díky vysoce citlivé celogenomové analýze metodou SNP array jsme detekovali i další kryptické rekurentní změny v genomu nemocných s nízkostupňovými gliomy. Nejčastěji se jednalo o delecce 6q (3/15), aberace zasahující 9p (2/15), delecí 19q (3/15) a UPD 17p (6/15).

Vůbec nejčastějším nálezem detekovaným metodou SNP array u nemocných s nízkostupňovými gliomy byla UPD krátkých ramen chromosomu 17. Tuto aberaci jsme

relativně často pozorovali také u nemocných s vysokostupňovými gliomy. Jednalo se o tzv. získanou uniparentální disomii (aUPD). UPD je stav, kdy obě alely určitého chromosomu, nebo jeho části pocházejí od jednoho rodiče (Tuna *et al.* 2009). Vrozená UPD vzniká chybou v meióze již během zárodečného vývoje a všechny buňky daného organismu tuto změnu nesou. Vzniká tak homozygotní stav dané oblasti. aUPD je naopak způsobena chybnou segregací v mitose a objevuje se pouze v části somatických buněk. Patologický potenciál aUPD spočívá v duplikaci oblasti nesoucí mutaci některého z tumor supresorových genů, imprintovaných genů nebo genů s epigenetickými modifikacemi. Takové chromosomové oblasti jsou metodami klasické a molekulární cytogenetiky vyhodnoceny jako normální. Význam aUPD v nádorových buňkách je v aktuálních studiích často diskutován. UPD patří k mechanismům, které vedou ke ztrátě heterozygoty. Tento jev je v nádorových buňkách často popisován právě v oblasti krátkých ramen chromosomu 17, kde je lokalizován tumor supresorový gen *TP53*, ztráta jehož funkce vede k neregulované proliferaci buňky (Maciejewski *et al.* 2008). Nález aUPD 17p u 6/15i pacientů s nízkostupňovým astrocytmem tak potvrzuje hypotézu, že změny genu *TP53* jsou častou událostí spojenou s patogenezí difúzních astrocytomů (Louis *et al.* 2008).

U vysokostupňových gliomů byla aUPD zahrnující oblast 17p zaznamenána u sedmi pacientů (7/19). Jednalo se o pět nemocných s anaplastickým astrocytmem a dva nemocné s primárním a/nebo sekundárním glioblastomem. U dvou pacientů s anaplastickým astrocytmem došlo k progresi nádoru. Nálezy aUPD 17p u nemocných s vysokostupňovými gliomy naznačuje, že změny exprese tohoto genu hrají roli i ve formování gliomů vyšších maligních stupňů.

Celkově jsme u nemocných s vysokostupňovými gliomy zaznamenali genetické aberace, které byly více heterogenní a vyskytovaly se s vyšší frekvencí než u pacientů s gliomy nižších stupňů, a/nebo nebyly u nízkostupňových vzorků nalézány vůbec. Vyšší počet potvrzených aberací nejen ve skupině, ale i u jednotlivých nemocných, koresponduje s výsledky recentních studií. Během evoluce patologického klonu dochází k postupné kumulaci nových chromosomových aberací, zvyšuje se tak heterogenita nádorových buněk, genomová nestabilita a celý proces vede k přechodu onemocnění do vyšších maligních stupňů (Zemanová *et al.* 2006).

Další aberací, kterou jsme zaznamenali v obou skupinách zhruba ve stejném poměru, byla trisomie chromosomu 7. Role zisku chromosomu 7 v patogenezi nádoru je spojována hlavně

protoonkogenem *EGFR*, účastnícím se buněčné signalizace a adheze (Ohgaki *et al.* 2004), jejímž důsledkem je ovlivnění exprese genů vedoucí k buněčné proliferaci. Případná deregulace této signální dráhy může tak vést k progresi nádoru. Zvýšená exprese *EGFR* byla popsána i u dalších typů nádorových onemocnění (Nicholson *et al.* 2001) a nadpočetné kopie chromosomu 7 byly prokázány i u vysokostupňových gliomů současně s amplifikacemi genu *EGFR* (Lopez-Gines *et al.* 2005). K amplifikaci *EGFR* dochází v nádorových buňkách asi u 30-60% nemocných s primárními glioblastomy (Ino *et al.* 2001) a to nejčastěji v podobě extrachromosomálních fragmentů (tzv. double minutes) s vysokým počtem genových kopií. V jiné studii byla amplifikace genu *EGFR* u nemocných s vysokostupňovými gliomy nalezena současně s amplifikací krátkých ramen chromosomu 10 (Idbaih *et al.* 2008). Předpokládá se, že tento gen hraje významnou úlohu při difúzní infiltraci glioblastomu do okolních tkání (Okada *et al.* 2003).

V našem souboru jsme v souladu s literaturou potvrdili nález trisomie 7 celkem v 35% vyšetřených vzorků vysokostupňových gliomů. V jednom případě jsme s trisomií 7 detekovali současně s amplifikací genu *EGFR*. Jednalo se o pacienta s primárním glioblastomem, u kterého došlo k progresi onemocnění. Domníváme se, že nález poměrně velkého buněčného klonu s patologickým nálezem (85%), spolu se současným výskytem dalších chromosomových změn souvisí s vysokou agresivitou tohoto nádoru.

K nejčastějším aberacím u vysokostupňových gliomů patřila i delece genu *p16* (*CDKN2A*) detekovaná metodou I-FISH celkem v sedmi případech (7/19). Metodou SNP array jsme tyto nálezy potvrdili u všech sedmi nemocných. Kromě toho jsme touto metodou deleci krátkých ramen chromosomu 9, zahrnují gen *p16* detekovali u dalších tří pacientů a upřesnili jsme i rozsah deletovaných úseků. Gen *p16* patří mezi tumor supresorové geny a hraje roli v regulaci buněčného cyklu prostřednictvím inhibice komplexů CDK 4,6/cyklin D (Sherr *et al.* 1999). Nález delece genu *p16* je v literatuře popisován jako velmi častá změna asociovaná s progresí gliomů do vyšších stupňů a bývá častým nálezem u glioblastomů, které jsou obecně spojeny se špatnou prognózou (Izumoto *et al.* 1995, Schmidt *et al.* 1994). V naší studii došlo u šesti pacientů s nálezem delece genu *p16* k recidivě onemocnění. Můžeme tedy potvrdit korelaci výskytu této aberace s agresivním typem nádoru a špatnou prognózou.

Mezi další často frekventované aberace ve druhé skupině zahrnující vysokostupňové gliomy patřily také změny chromosomu 10. Metodou I-FISH jsme v pěti případech zaznamenali monosomii 10 (1×primární glioblastom, 4×sekundární glioblastom). Vyšetření

metodou SNP array potvrdilo výsledky I-FISH a přispělo i záchytu dalších nebalancovaných změn. Celkem jsme tedy nebalancované aberace chromosomu 10 detekovali u jedenácti nemocných s vysokostupňovými gliomy. V sedmi případech se jednalo o monosomie (1×anaplastický astrocytom, 2×primární glioblastom, 4×sekundární glioblastom), ve dvou případech o delece v oblasti krátkých ramen (2×anaplastický astrocytom) a u dalších dvou nemocných jsme detekovali aUPD (sekundární glioblastom) a fragmentaci chromosomu 10 v důsledku tzv. chromothripsis (anaplastický astrocytom). Monosomie 10 je popisována jako častá změna typická zejména pro nemocné s primárními glioblastomy (Amalfitano *et al.* 2000). V naší studii jsme monosomii 10 zaznamenali rovněž u čtyř nemocných s původní diagnózou sekundární glioblastom. Analýza dalších chromosomových změn u těchto případů nepotvrdila jiné aberace charakteristické pro sekundární glioblastomy, proto předpokládáme, že se ve všech čtyřech případech jedná právě o primární glioblastom.

Zajímavým nálezem zasahujícím chromosom 10 byla chromothripsis terminální části dlouhých ramen u nemocného s anaplastickým astrocytmem (TK 545). Tento nedávno popsáný mechanismus vzniku chromosomových aberací spočívá rozpadu jednoho nebo více chromosomů na mnoho malých částí, které jsou v dalším kole buněčného cyklu ztraceny, amplifikovány, nebo se stanou základem pro nové přestavěné chromosomy. Podle aktuálních studií je tato aberace mnohem častější, než se doposud předpokládalo a to především u vysoce agresivních forem nádorů (Maher *et al.* 2012). První nález chromothripsis byl popsán u pacientky s chronickou lymfoblastickou leukémií (CLL) (Stephens *et al.* 2011). Vzácně je tato aberace nalézána v i germinálních buňkách. V naší studii byla chromothripsis detekována pouze v jednom případě. Tyto výsledky poukazují na fakt, že chromothripsis zřejmě nebude tak častou změnou asociovanou s mozkovými gliomy.

Hlavním genem spojovaným s patogenezí gliomů a lokalizovaným na chromosomu 10 je *PTEN*, který hraje roli v proliferaci, migraci, angiogenezi a sebeobnově kmenových buněk (Endersby *et al.* 2008). Snížená exprese tohoto genu v důsledku delecí, vede k deregulaci těchto buněčných dějů. Samostatnou delecí genu *PTEN*, charakteristickou pro primární glioblastomy (Tohma *et al.* 1998), jsme potvrdili v naší studii u jednoho pacienta s tímto typem nádoru.

Metoda SNP array nám umožnila detekovat v genomu nádorových buněk i řadu dalších kryptických změn. V naší práci jsme se podrobně zaměřili na chromosomy, u kterých

byly tyto změny nalézány nejčastěji a dále na ty, které mají významný diagnostický potenciál. Jednalo se o chromosomy 1, 7, 17 a 19.

Analýza chromosomu 1 potvrdila nejčastější ztrátu v oblasti krátkých ramen. Jednalo se o čtyři případy delece celých p ramen (1×difúzní astrocytom, 1×oligodendrogliom, 1×anaplastický oligodendrogliom, 1×sekundární glioblastom). U obou pacientů s oligodendroglíálními nádory byla zároveň potvrzena delece dlouhých ramen chromosomu 19 v oblasti 19q13. Detailnější analýza zlomových míst potvrdila, že v těchto případech vznikla kombinovaná delece 1p/19q v důsledku nebalancované translokace $der(1)t(1;19)(q10;p10)$, při které vzniká derivovaný chromosom 1 složený z krátkých ramen chromosomu 1 a krátkých ramen chromosomu 19. Stejný typ kombinované delece jsme potvrdili také u pacienta se sekundárním glioblastomem. V tomto případě lze proto předpokládat, že sekundární glioblastom vznikl progresí z oligodendroglíálních buněk. Další současně detekované chromosomové aberace byly naopak charakteristické pro astrocytární nádory (aUDP 17, trisomie 7, delece *p16*), proto je zřejmé, že nádor obsahoval jak oligodendroglíální tak astrocytární složku a s největší pravděpodobností se tak ve skutečnosti jednalo o smíšený oligoastrocytom. Ve čtyřech případech jsme zaznamenali terminální delece krátkých ramen chromosomu 1 (1×difúzní astrocytom, 3×sekundární glioblastom) a dlouhá ramena chromosomu 19 zároveň zůstala zachována. Tyto aberace tak vznikly jiným mechanismem, než kombinovaná delece 1p/19q. Tyto výsledky potvrzují hypotézu, která předpokládá v oblasti 1p výskyt několika kandidátních tumor supresorových genů či onkogenů, které by mohly souviset s patogenezí různých nádorových onemocnění (Smith *et al.* 1999). Kandidátní gen v této oblasti se však zatím nepodařilo přesně určit.

Ve dvou vzorcích sekundárních glioblastomů byla zároveň s terminální delecí krátkých ramen nelezena amplifikace zahrnující oblast dlouhých ramen chromosomu 1. Tato aberace je ve studiích věnující se problematice mozkových gliomů popisována méně často, proto jsme se rozhodli ji blíže analyzovat. Zisk genetického materiálu na 1q, je častěji spojován s jinými typy mozkových nádorů například ependymomy (Rand *et al.* 2008), ale i dalšími solidními tumory, jako například s rakovinou prsu (Pandis *et al.* 1992). U obou nemocných zahrnovala amplifikovaná oblast úsek 1q32.1. V této lokalitě se nachází řada genů, které jsou často spojovány s maligními onemocněními. Kandidátním genem v oblasti 1q32.1, u něhož byla zvýšená exprese popsána i u dalších solidních tumorů, je *NUCKS1*. Proteinový produkt tohoto genu je jaderný vazebný protein, který bývá vysoce fosforylován a hraje důležitou roli v buněčném cyklu jako substrát cyklin dependentních kináz (Østvold *et al.* 2001). Zvýšená

exprese *NUCKS1*, způsobená amplifikací v oblasti 1q32.1, je popsána v několika studiích zabývajících se solidními tumory. Jedná se především o rakovinu prsu (Soliman *et al.* 2013), kde je tento nález spojen s horší progózou. Zvýšená exprese tohoto genu vede k deregulaci buněčného cyklu a nadměrné proliferaci, což jsou charakteristické vlastnosti nádorových buněk.

Podrobněji jsme analyzovali i rozsah nebalancovaných změn na chromosomu 7. Nejčastěji se jednalo o zisk genetického materiálu, který jsme zaznamenali celkem v sedmi případech. Minimální společná oblast amplifikovaná u všech nemocných byla identifikována v pruhu 7p11.2. V této oblasti jsme se zaměřili na geny, jejichž proteinové produkty by mohly ovlivnit normální fyziologii buňky a mohly tak přispět k nádorové transformaci. Chromosomový pruh 7p11.2 je spojován především s lokalizací genu *EGRF*. Další kandidátní gen v této oblasti je například *GRB10*. Protein GRB10 patří do rodiny adaptorových proteinů s PH a SH3 doménou, jehož substráty jsou kinázové receptory Raf1/MEK1 (Nantel *et al.* 1998). Nadměrná exprese genu způsobená zvýšením genové dávky má za následek deregulaci buněčné signalizace, tvorbu kolonií, invazivitu a migraci buněk (Khan *et al.* 2013). Tyto buněčné tak změny mohou přispívat k malignitě a agresivitě gliomů.

Změny na chromosomu 17 jsou velmi často popisovanými nálezy v nádorových buňkách. Rovněž naše studie potvrdila vysokou frekvenci výskytu změn na chromosomu 17. Jednalo se nejčastěji o aUPD zasahující oblast krátkých ramen. Minimální společná oblast aUPD detekovaná u všech nemocných zahrnovala úsek p13.1 až p13.3. V této oblasti se kromě genu *TP53* nachází další významný gen *AURKB*. Proteinový produkt *AURKB* hraje roli v segregaci chromosomů v mitóze, kde brání nesprávnému rozchodu chromosomů. Pokud tento protein rozpozná chybné napojení chromosomu na mikrotubuly dělicího vřeténka, dojde k zastavení buněčného cyklu (Kallio *et al.* 2002). V nádorech se sníženou expresí *AURKB* dochází k nesprávné segregaci chromosomů do dceřiných buněk, což může mít za následek vznik nadpočetných chromosomů nebo monosomií. Asociaci deregulace exprese *AURKB* s výskytem aneuploidií popsali ve své studii Ota a kol. (2002).

Třetí kandidátní tumor supresorový gen v dané lokalitě, o kterém se domníváme, že jeho změny mohou souviset s vznikem a rozvojem mozkových gliomů, je *HIC1*. Tento gen kóduje transkripční faktor, který patří do rodiny transkripčních faktorů se strukturním motivem zinkového prstu. Jednou z jeho rolí je i regulace exprese genu *TP53* (Wales *et al.* 1995). Hypermetylace tohoto genu byla pospána u mnoha solidních tumorů, například u

rakoviny prsu (Fujii *et al.* 1998), ale taky jako pozdní událost spojená s hematologickými malignitami, kde byl tento nález popsán především u chronické myeloidní leukémie (Issa *et al.* 1997).

V poslední části našeho výzkumu jsme se zaměřili na pacienty, u nichž došlo k recidivě či progresi onemocnění a byla u nich provedena druhá resekce nádoru. U pacienta (TK 526) kterému byl při první resekci diagnostikován anaplastický astrocytom, nebyly metodou I-FISH ve druhém odběru identifikovány žádné nové aberace. SNP array nově detekovala kryptické delece 11p, 13q, 14q a 18p. Nemůžeme vyloučit, že nalezené nebalancované změny mohou být jednou z příčin recidivy u tohoto pacienta.

Druhý pacient (TK 538) byl původně zařazen do skupiny nízkostupňových gliomů s diagnózou difúzní astrocytom - grade II. V průběhu následujícího roku došlo k recidivě spojené s progresí tumoru a ke stanovení diagnózy anaplastický astrocytom grade III. Metodou I-FISH jsme při opakované resekci detekovali nové aberace (delece *RB1*, trisomie 7) ve velmi nízkém procentu nad hranicí cut off (5–6%). Obě změny jsou podle literárních údajů asociovány s progresí onemocnění (Arslantas *et al.* 2004, Biernat *et al.* 1997). Kromě zmíněných aberací jsme metodou SNP array dále identifikovali další nové nebalancované aberace. Jednalo se delece 8q, 10q a nadpočetné kopie oblastí 10p, 13q a 19p. Z těchto výsledků vyplývá, že progresi nízkostupňových gliomů do vyšších gradů je spojena s kumulací změn, jejichž důsledkem dochází k malignímu zvratu buňky a progresi nádoru.

U pacienta TK549, u kterého byla primárně stanovena diagnóza anaplastický astrocytom stupeň III, byla při opakované resekci stanovena diagnóza sekundární glioblastom stupeň IV. Vyšetřením metodou I-FISH jsme prokázali nově deleci genu *RB1* a trisomii chromosomu 7 (10-14%). V tomto případě se jednalo o nízké zastoupení buněk s aberací, proto jsme tyto změny nebyli schopni potvrdit mikročipovou technologií. Detekční limit metody SNP array je zhruba kolem 20 % buněk s aberací.

Výsledky molekulárně cytogenetických analýz u všech tří nemocných svědčily o postupném hromadění chromosomových změn a zvyšující se genomové nestabilitě. Následkem kumulace genetických změn byla u prvního pacienta s anaplastickým astrocytome recidiva nádoru a u dalších dvou nemocných vývoj agresivnějšího patologického klonu a progresi onemocnění. Ve všech případech se jedná o lineární klonální vývoj spojený s progresí nádorových buněk. Při vzniku některých typů nádorových onemocnění můžeme pozorovat i tzv. divergentní klonální vývoj. Ten se vyznačuje

současným nálezem různých patologických klonů, které nesou některé společné aberace a v jiných aberacích se liší. Předpokládá se, že v tomto procesu oba klony vznikají ze stejné výchozí buňky a pak se každý vyvíjí samostatně a postupně v něm vznikají další změny unikátní pro konkrétní klon. Divergentní klonální vývoj je však možné detekovat pouze v mitosách a proto jsme ho v této studii nepozorovali (vyšetřovali jsme pouze interfázní jádra a/nebo celegenomovou DNA).

V této práci jsme kombinací dvou molekulárně cytogenetických metod – I-FISH a SNP array - vyšetřili skupinu nemocných s mozkovými gliomy. Potvrdili jsme, že každá metoda má svoje výhody i limity. Metodou I-FISH jsme cíleně detekovali známé specifické aberace charakteristické pro gliální buňky a to i v buněčných klonech s velice nízkým zastoupením (cut off 2,5% respektive 5%). Pomocí metody SNP array jsme vyšetřili v jednom experimentu celý genom, a tudíž jsme současně zaznamenali všechny nebalancované změny přítomné v nádorových buňkách a byli rovněž schopni detekovat kvalitativní zastoupení jednotlivých SNP alel. Detekovali jsme například oblasti aUPD, jejichž vznik není doprovázen změnou počtu kopií DNA, a proto jej nelze identifikovat při analýze I-FISH. Pravděpodobně však hrají významnou roli při vzniku a progresi nádoru. Výsledky metod I-FISH a SNP array se tedy vzájemně doplňují a jejich kombinace přináší informace, které by v budoucnosti mohly přispět k odhalení dalších významných chromosomových změn a kandidátních genů v genomu nemocných s mozkovými gliomy. Předpokládáme, že tyto informace by v budoucnu mohly být využity rovněž při vývoji nových terapeutických přístupů, zaměřených cíleně na molekulárně genetické změny v buňkách mozkových gliomů, podobně jako se to už podařilo i u některých jiných typů nádorových onemocnění.

8 Souhrn

Cílem této práce bylo provést detailní molekulárně cytogenetickou analýzu genomu nádorových buněk u nemocných s histologicky potvrzenými mozkovými gliomy.

Add1. Metodou I-FISH jsme vyšetřili celkem 38 vzorků mozkové tkáně získaných od 35 nemocných s různými gliomovými subtypy. U 9/35 pacientů byl touto metodou potvrzen normální nález. Nejčastějším nálezem u pacientů s nízkostupňovými gliomy byla trisomie chromosomu 7 zachycená u 33% nemocných. U vysokostupňových gliomů byly nejčastějšími nálezy trisomie chromosomu 7 a delece *p16* zachycené v obou případech u 35% nemocných. U nemocných s oligodendrogliálními prvky gliomu jsme zaznamenali kombinovanou delecí 1p36/19q13 v 75% případů.

Add2. Porovnali jsme nálezy u nemocných s nízkostupňovými a vysokostupňovými gliomy. U nemocných s gliomy stupně I-II jsme zaznamenali celkově méně aberací, které vykazovaly nízkou heterogenitu ve srovnání se skupinou nemocných s tumory stupně III-IV. Potvrdili jsme tak hypotézu, že postup gliomu do vyšších stupňů je spojen se získáním a kumulací genetických změn. V obou skupinách jsme zaznamenali výskyt trisomie chromosomu 7, terminální delece 1p36, kombinované delece 1p36/19q13, delece genu *p16*, a UPD 17p. Naopak monosomii chromosomu 10, delecí *PTEN*, amplifikaci *EGFR* a chromothripsis jsme pozorovali pouze v genomu nádorových buněk nemocných s vysokostupňovými gliomy.

Add3. Metodou SNP array jsme vyšetřili 35 vzorků gDNA získané od 32 pacientů. Pozorovali jsme nebalancované změny v různých nádorových subtypech a stupních malignity. Zásadní byl nález kombinované delece 1p36/19q13 u nemocných s oligodendrogliomy, který je u těchto nemocných dobrým prognostickým faktorem. Dalším důležitým nálezem byla aUPD 17p, která je považována za jeden z mechanismů LOH v oblasti 17p, zahrnující tumor supresorový gen *TP53*. U nemocných s astrocytomy vyšších stupňů jsme opakovaně detekovali ztrátu genetického materiálu na chromosomu 10 (monosomie 10, delece *PTEN*). U jednoho pacienta s anaplastickým astrocytomech jsme pozorovali fragmentaci terminální části dlouhých ramen chromosomu 10 v důsledku chromothripsis.

Add4. Porovnali jsme výsledky získané metodami I-FISH a SNP array. Výsledky obou metod ve většině případů dobře korelovaly. U několika nemocných došlo k neshodám,

kteřé lze vysvětlit mimo jiné odlišnou citlivostí použitých metod. Metodou I-FISH jsme schopni zachytit sledované změny i ve velmi malých buněčných klonech v závislosti na stanovené hranici pozitivit (cut off 2,5% respektive 5%). Sledujeme však cíleně pouze konkrétní aberace v závislosti na použitých DNA sondách. Metodou SNP array jsme schopni vyšetřit v jednom experimentu celý genom studovaných buněk a upřesnit tak výsledky I-FISH, případně detekovat další kryptické nebalancované změny. Metoda však umožňuje detekovat pouze takové aberace, které jsou přítomny minimálně ve 20% buněk. Kombinace těchto dvou metod přináší důležité informace o genomu nádorových buněk a významně přispívá ke zpřesnění diagnostiky mozkových gliomů.

Add5. Sledovali jsme frekvenci a význam nejčastějších rekurentních aberací v buňkách mozkových nádorů a zaměřili jsme se na analýzu rozsahu nebalancovaných změn na jednotlivých chromosomech. V nejčastěji postižených chromosomových oblastech jsme vytypovali kandidátní geny, které by mohly hrát důležitou roli ve vývoji a progresi gliomů. Mezi takové geny patří například *NUCKS1*, *GRB10*, *AURKB* a *HIC1*. Sledovali jsme rovněž lineární klonální vývoj a kumulaci aberací v nádorových buňkách u tří nemocných s recidivou a/nebo progresí nádoru, u kterých byly provedeny opakované odběry. Předpokládáme, že získ těchto změn by se také mohl podílet na progresi nádoru. V předkládané diplomové práci byly splněny všechny vytyčené cíle. Práce přináší ucelený přehled výsledků molekulárně cytogenetické analýzy buněk mozkových gliomů. Popisuje nejčastější rekurentní chromosomové aberace v různých nádorových subtypech a posuzuje jejich možný vliv na patogenezi gliomů. Dále identifikuje kandidátní geny lokalizované v nejčastěji postižených chromosomových oblastech, jejichž změny mohou hrát roli ve vývoji mozkových nádorů. Další studium těchto genů může přispět k lepšímu pochopení vzniku a progresu mozkových nádorů a v budoucnu i k vývoji cílené protinádorové léčby.

9 Seznam použité literatury

Amalfitano, G., Chatel, M., Paquis, P., Michiels, J. F. (2000): Fluorescence in situ hybridization study of aneuploidy of chromosomes 7, 10, X, and Y in primary and secondary glioblastomas. *Cancer Genet Cytogenet* 116(1):6-9.

Arslantas, A., Artan, S., Öner, Ü., Müslümanoğlu, H., Durmaz, R., Cosan, E., Atasoy, M.A., Basaran, N., Tel, E. (2004): The importance of genomic copy number changes in the prognosis of glioblastoma multiforme. *Neurosurg Rev*, 27(1):58-64.

Arslantas, A., Artan, S., Öner, Ü., Müslümanoğlu, M. H., Özdemir, M., Durmaz, R., Arslantas, D., Vural, M., Cosan, E., Atasoy, M. A. (2007): Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Pathol Oncol Res*, 13(1):39-46.

Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F., Delattre, J. Y. (2003): Primary brain tumours in adults. *Lancet*, 361(9354):323-331.

Biernat, W., Tohma, Y., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. (1997): Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta neuropathol*, 94(4):303-309.

Blume-Jensen, P., Hunter, T. (2001): Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835):355-365.

Bögler, O., Su Huang, H. J., Kleihues, P., Cavenee, W. K. (1995): The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia*, 15(3):308-327.

Bulik, M., Jancalek, R., Vanicek, J., Skoch, A., Mechl, M. (2013): Potential of MR spectroscopy for assessment of glioma grading. *Clin Neurol Neurosurg*, 115(2):146-153.

Cairncross, G. J., Berkey, B., Shaw, E., Jenkins, R., Scheithauer, B., Brachman, D., Buckner, J., Fink, K., Souhami, L., Laperriere, N., Mehta, M., Curran, W. (2006): Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol*, 24(18):2707-2714.

Cairncross, J. G., Ueki, K., Zlatescu, M. C., Lisle, D. K., Finkelstein, D. M., Hammond, R. R., Silver, J. S., Stark, P. C., Macdonald, D. R., Ino, Y., Ramsay, D. A., Louis, D. N. (1998): Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*, 90(19):1473-1479.

Cankovic, M., Nikiforova, M. N., Snuderl, M., Adesina, A. M., Lindeman, N., Wen, P. Y., Lee, E. Q. (2013): The role of MGMT testing in clinical practice: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn*, 15(5):539-555.

Coons, S. W., Johnson, P. C., Scheithauer, B. W., Yates, A. J., Pearl, D. K. (1997): Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer*, 79(7):1381-1393.

Crocetti, E., Trama, A., Stiller, C., Caldarella, A., Soffietti, R., Jaal, J., Weber, D. C., Ricardi, U., Slowinski, J., Brandes, A.; RARECARE working group. (2012): Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer*, 48(10):1532-1542.

Duerr, E. M., Rollbrocker, B., Hayashi, Y., Peters, N., Meyer-Puttlitz, B., Louis, D. N., Schramm, J., Wiestler, O. D., Parsons, R., Eng, C. *et al.* (1998): PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene*, 16(17):2259-2264.

Duesberg, P., Li, R. (2003): Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle*, 2(3):201-209.

Dušek, L., Mužík, J., Kubásek, M., Koptíková, M., Žaloudík, J., Vyzula, R. (2005): Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita.[cit. 2013-3-25].

Endersby, R., Baker, S. J. (2008): PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene*, 27(41):5416-5430.

Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S. N., Hidalgo, O. F., Vanaclocha, V., Baylin S. B., Herman, J. G. (2000): Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *Engl J Med*, 343(19):1350-1354.

Fadrus, P., Lakomý, R., Hübnerová, P., Slabý, O., Keřkovský, M., Svoboda, T., Vybíhal, V., Neuman, E., Kryštofová, S., Sova, M., *et al.* (2010): Intrakraniální nádory – diagnostika a terapie. *Interni Med. pro praxi*, 12(7 a 8):376–378.

Fallon, K. B., Palmer, C. A., Roth, K. A., Nabors, L. B., Wang, W., Carpenter, M., Banerjee, R., Forsyth, P., Rich, K., Perry, A. (2004): Prognostic Value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH Analyses in Recurrent Oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63(4):314-322.

Fujii, H., Biel, M. A., Zhou, W., Weitzman, S. A., Baylin, S. B., Gabrielson, E. (1998): Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *Oncogene*, 16(16):2159-2164.

Hartmann, C., Hentschel, B., Tatagiba, M., Schramm, J., Schnell, O., Seidel, C., Stein, R., Reifenberger, G., Pietsch, T., von Deimling, A., *et al.* (2011): Molecular markers in low-grade gliomas: predictive or prognostic?. *Clin Cancer Res*, 17(13):4588-4599.

Hiremath, G. K., Bingaman, W. E., Prayson, R. A., Nair, D. (2007): Oligoastrocytoma presenting with intractable epilepsy. *Epileptic Disord*, 9(3):315-322.

Hirose, Y., Aldape, K. D., Chang, S., Lamborn, K., Berger, M. S., Feuerstein, B. G. (2003): Grade II astrocytomas are subgrouped by chromosome aberrations. *Cancer Genet Cytogenet*, 142(1):1-7.

Holland, H., Koschny, T., Ahnert, P., Meixensberger, J., Koschny, R. (2010): WHO grade-specific comparative genomic hybridization pattern of astrocytoma – A meta-analysis. *Pathol Res Pract*, 206(10):663-668.

Idbaih, A., Marie, Y., Lucchesi, C., Pierron, G., Manié, E., Raynal, V., Mosseri, V., Hoang-Xuan, K., Kujas, M., Brito, I. *et al.* (2008): BAC array CGH distinguishes mutually exclusive alterations that define clinicogenetic subtypes of gliomas. *Int J Cancer*, 122(8):1778-1786.

Ichimura, K., Bolin, M. B., Goike, H. M., Schmidt, E. E., Moshref, A., Collins, V. P. (2000): Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res*, 60(2):417-424.

Ino, Y., Betensky, R. A., Zlatescu, M. C., Sasaki, H., Macdonald, D. R., Stemmer-Rachamimov, A. O., Ramsay, D., Cairncross, J. G., Louis, D. N. (2001): Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma implications for patient management at diagnosis. *Clin Cancer Res*, 7(4):839-845.

Issa, J. P. J., Zehnbauser, B. A., Kaufmann, S. H., Biel, M. A., Baylin, S. B. (1997): HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer research*, 57(9):1678-1681.

Izumoto, S., Arita, N., Ohnishi, T., Hiraga, S., Taki, T., Hayakawa, T. (1995): Homozygous deletions of p16 INK4A/MTS1 and p15 INK4B/MTS2 genes in glioma cells and primary glioma tissues. *Cancer lett*, 97(2):241-247.

Jones, D. T., Kocialkowski, S., Liu, L., Pearson, D. M., Bäcklund, L. M., Ichimura, K., Collins, V. P. (2008): Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res*, 68(21):8673-8677.

Kallio, M. J., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Gorbsky, G. J. (2002): Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis. *Current biology*, 12(11):900-905.

Kelly, J. J., Stechishin, O. D., Chan, J. A., Beauchamp, D., Perizzolo, M., Demetrick, D. J., Steele, L., Auer, R. N., Hader, W. J., Westgate, M. *et al.* (2010): Oligodendroglioma cell lines containing t (1; 19)(q10; p10). *Neuro Oncol*, 12(7):745-55.

Kesari, S. (2011): Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. In *Semin in oncol*, WB Saunders, 2011. Vol. 38, pp. S2-S10.

Khan, M. I., Adhami, V. M., Lall, R. K., Syed, D. N., Siddiqui, I. A., Hafeez, B. B., Verma, A. K., Mukhtar, H. (2013): Grb10, a negative regulator of insulin signaling, is a tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res*, 73(8 Supplement):4312-4312.

Kitange, G., Misra, A., Law, M., Passe, S., Kollmeyer, T. M., Maurer, M., Ballman, K., Feuerstein, B. G., Jenkins, R. B. (2005): Chromosomal imbalances detected by array comparative genomic hybridization in human oligodendrogliomas and mixed oligoastrocytomas. *Genes Chrom Cancer*, 42(1):68-77.

Kleihues, P., Cavenee, W. K. (2000): Pathology and genetics of tumours of the nervous system. 2nd edition ed. Lyon. IARC Press, ISBN92-832-2409-4.

Kleihues, P., Ohgaki, H. (1999): Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*, 1(1):44-51.

Kozler, P., Beneš, V., Chytka, T., Kramář, F. (2007): Intrakraniální nádory. Praha , Galén, Karolinum, 2007, ISBN-13: 978-80-7262-452-2.

Kramář, F., Zemanová, Z., Michalová, K., Babická, L., Ransdorfová, S., Hrabal, P., Kozler, P. (2007): Cytogenetic analyses in 81 patients with brain gliomas: correlation with clinical outcome and morphological data. *J Neurooncol*, 84(2):201-211.

Labussiere, M., Idbaih, A., Wang, X. W., Marie, Y., Boisselier, B., Falet, C., Paris, S., Carpentier, C., Crinière, E., Ducray, F. *et al.* (2010): All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology*, 74(23):1886-1890.

LaFramboise, T. (2009): Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucl Acid Res*, 37.13:4181-4193.

Lee, S. M., Koh, H. J., Park, D. C., Song, B. J., Huh, T. L., Park, J. W. (2002): Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med*, 32(11):1185-1196.

Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R. *et al.* (1997): PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275(5308):1943-1947.

Loeper, S., Romeike, B. F. M., Heckmann, N., Jung, V., Henn, W., Feiden, W., Zang, K. D., Urbschat, S. (2001): Frequent mitotic errors in tumor cells of genetically micro-heterogeneous glioblastomas. *Cytogenet Cell Genet*, 94(1-2):1-8.

Lopez-Gines, C., Cerda-Nicolas, M., Gil-Benso, R., Pellin, A., Lopez-Guerrero, J. A., Callaghan, R., Benito, R., Roldan, P., Piquer, J., Llacer, J. *et al.* (2005): Association of chromosome 7, chromosome 10 and EGFR gene amplification in glioblastoma multiforme. *Clin Neuropathol*, 24(5):209-218.

Louis, D. N. (1994): The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropath Exp Neur*, 53(1):11-21.

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., Kleihues, P. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114(2):97-109.

- Maciejewski, J. P., Mufti, G. J. (2008): Whole genome scanning as a cytogenetic tool in hematologic malignancies. *Blood*, 112(4):965-974.
- Maher, C. A., Wilson, R. K. (2012): Chromothripsis and human disease: piecing together the shattering process. *Cell*, 148(1):29-32.
- Malley, D. S., Hamoudi, R. A., Kocialkowski, S., Pearson, D. M., Collins, V. P., Ichimura, K. (2011): A distinct region of the MGMT CpG island critical for transcriptional regulation is preferentially methylated in glioblastoma cells and xenografts. *Acta neuropathol*, 121(5):651-661.
- Marko, N. F., Weil, R. J. (2013): The molecular biology of WHO Grade II gliomas. *Neurosurg focus*, 34(2):E1.
- Matsuzaki, H., Loi, H., Dong, S., Tsai, Y. Y., Fang, J., Law, J., Di, X., Liu, W. M., Yang, G., Liu, G., Huang, J., *et al.* (2004): Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. *Genome Res*, 14(3): 414-425.
- McKinnon, R. D., Waldron, S., Kiel, M. E. (2005): PDGF α -receptor signal strength controls an RTK rheostat that integrates phosphoinositol 3-kinase and phospholipase C γ pathways during oligodendrocyte maturation. *J Neurosci*, 25(14):3499-3508.
- Nakamura, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. (2001): Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest*, 81(1):77-82.
- Nantel, A., Mohammad-Ali, K., Sherk, J., Posner, B. I., Thomas, D. Y. (1998): Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. *J Biol Chem*, 273(17):10475-10484.
- Natarajan, A. T., Vermeulen, S., Darroudi, F., Valentine, M. B., Brent, T. P., Mitra, S., Tano, K. (1992): Chromosomal localization of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization. *Mutagenesis*, 7(1): 83-85.
- Nieto-Sampedro, M., Valle-Argos, B., Gómez-Nicola, D., Fernández-Mayoralas, A., Nieto-Díaz, M. (2011): Inhibitors of glioma growth that reveal the tumour to the immune system. *Clin Med Insights Oncol*, 5:265-314.
- Nicholson, R. I., Gee, J. M. W., Harper, M. E. (2001): EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*, 37:9-15.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schüler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C. *et al.* (2004): Genetic Pathways to Glioblastoma A Population-Based Study. *Cancer Res*, 64(19):6892-6899.
- Okada, Y., Hurwitz, E. E., Esposito, J. M., Brower, M. A., Nutt, C. L., Louis, D. N. (2003): Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Res*, 63(2):413-416.

- Olson, D. C., Marechal, V., Momand, J., Chen, J., Romocki, C. L. A. J., Levine, A. J. (1993): Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene*, 8(9):2353-2360.
- Østvold, A. C., Norum, J. H., Mathiesen, S., Wanvik, B., Sefland, I., Grundt, K. (2001): Molecular cloning of a mammalian nuclear phosphoprotein NUCKS, which serves as a substrate for Cdk1 in vivo. *Eur J Biochem*, 268(8):2430-2440.
- Ota, T., Suto, S., Katayama, H., Han, Z. B., Suzuki, F., Maeda, M., Tanino, M., Terada, Y., Tatsuka, M. (2002): Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res*, 62:5168–5177.
- Pandis, N., Heim, S., Bardi, G., Idvall, I., Mandahl, N., Mitelman, F. (1992): Whole-arm t (1; 16) and i (1q) as sole anomalies identify gain of 1 q as a primary chromosomal abnormality in breast cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 5(3):235-238.
- Rand, V., Prebble, E., Ridley, L., Howard, M., Wei, W., Brundler, M. A., Fee, B. E., Riggins, G. J., Coyle, B., Grundy, R. G. *et al.* (2008): Investigation of chromosome 1q reveals differential expression of members of the S100 family in clinical subgroups of intracranial paediatric ependymoma. *Br J Cancer*, 99(7):1136-1143.
- Ransom, D. T., Ritland, S. R., Kimmel, D. W., Moertel, C. A., Dahl, R. J., Scheithauer, B. W., Kelly, P. J., Jenkins, R. B. (1992): Cytogenetic and loss of heterozygosity studies in ependymomas, pilocytic astrocytomas, and oligodendrogliomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 5(4):348-356.
- Reifenberger, G., Collins, V. P. (2004): Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med*, 82(10):656-670.
- Reifenberger, G., Liu, L., Ichimura, K., Schmidt, E. E., Collins, V. P. (1993): Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer res*, 53(12):2736-2739.
- Reifenberger, J., Reifenberger, G., Liu, L., James, C. D., Wechsler, W., Collins, V. P. (1994): Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J pathol*, 145(5):1175.
- Ruas, M., Peters, G. (1998): The p16 INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*, 1378(2):F115-F177.
- Sandberg, A. A., Ishihara, T., Moore, G. E., Pickren, J. W. (1963): Unusually high polyploidy in a human cancer. *Cancer*, 16(10):1246-1254.
- Sciuscio, D., van Dommelen, K., Martinet, D., Jones, G., Janzer, R. C., Pollo, C., Hamou, M. F., Kaina, B., Stupp, R., Levivier, M. *et al.* (2011): Extent and patterns of MGMT promoter methylation in glioblastoma-and respective glioblastoma-derived spheres. *Clin Cancer Res*, 17(2):255-266.

- Serrano, M., Hannon, G. J., Beach, D. (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366(6456):704-707.
- Shaffer, L. G., McGowan-Jordan, J., Schmid, M. (2013): "ISCN 2013." An international system for human cytogenetics nomenclature. S Karger AG, Basel.
- Sherr, C. J., Roberts, J. M. (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 13(12):1501-1512.
- Shibahara, I., Sonoda, Y., Kanamori, M., Saito, R., Kumabe, T., Tominaga, T. (2011): New insights into glioma classification based on isocitrate dehydrogenase 1 and 2 gene status. *Brain tumor pathol*, 28(3):203-208.
- Schmidt, E. E., Ichimura, K., Reifenberger, G., Collins, V. P. (1994): CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res*, 54(24):6321-6324.
- Schmidt, M. C., Antweiler, S., Urban, N., Mueller, W., Kuklik, A., Meyer-Puttlitz, B., Wiestler, O.D., Louis, D.N., Fimmers, R., von Deimling, A. (2002): Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(4):321-328.
- Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., Wrensch, M. (2006): Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*, 2(9):494-503.
- Silber, J. R., Bobola, M. S., Blank, A., Chamberlain, M. C. (2012): O 6-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. *Biochim Biophys Acta*, 1826(1):71-82.
- Smith, J. S., Alderete, B., Minn, Y., Borell, T. J., Perry, A., Mohapatra, G., Hosek, S. M., Kimmel, D., O'Fallon, J., Yates, A. *et al.* (1999): Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene*, 18(28):4144-4152.
- Smith, J. S., Tachibana, I., Passe, S. M., Huntley, B. K., Borell, T. J., Iturria, N., O'Fallon, J. R., Schaefer, P. L., Scheithauer, B. W., James, C. D. *et al.* (2001): PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst*, 93(16):1246-1256.
- Soliman, N. A., Zineldeen, D. H., El-Khadrawy, O. H. (2013): Effect of NUCKS-1 overexpression on cytokine profiling in obese women with breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(2):837-845.
- Stephens, P. J., Greenman, C. D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G. R., Mudie, L. J., Pleasance, E. D., Lau, K. W., Beare, D., Stebbings, L. A. *et al.* (2011): Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, 144(1):27-40

Tohma, Y., Gratas, C., Biernat, W., Peraud, A., Fukuda, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. (1998): PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57(7):684-689.

Tohma, Y., Gratas, C., Biernat, W., Peraud, A., Fukuda, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. (1998): PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57(7):684-689.

Tuna, M., Knuutila, S., Mills, G. B. (2009): Uniparental disomy in cancer. *Trends Mol Med*, 15(3):120-128.

Van den Bent, M. J., Looijenga, L. H., Langenberg, K., Dinjens, W., Graveland, W., Uytendewilligen, L., Sillevius, Smitt, P. A., Jenkins, R., Kros, J. M. (2003): Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features. *Cancer*, 97(5):1276-1284.

Verhaak, R. G., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G. *et al.* (2010): Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1):98-110.

Vertosick Jr, F. T., Selker, R. G., Arena, V. C. (1991): Survival of patients with well-differentiated astrocytomas diagnosed in the era of computed tomography. *Neurosurgery*, 28(4):496-501.

Vranová, V., Nečaslová, E., Kuglík, P., Cejpek, P., Pešáková, M., Budínská, E., Relichová, J., Veselská, R. (2007): Screening of genomic imbalances in glioblastoma multiforme using high-resolution comparative genomic hybridization. *Oncol rep*, 17(2):457-464.

Wales, M. M., Biel, M. A., El Deiry, W., Nelkin, B. D., Issa, J. P., Cavenee, W. K., Kuerbitz, S. J., Baylin, S. B. (1995): p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13. 3. *Nat Med*, 1(6):570-577

Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., Vogelstein, B. (1992): Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(7):2965-2969.

Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., Levine, A. J. (1993): The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, 7(7a):1126-1132.

Xu, X., Zhao, J., Xu, Z., Peng, B., Huang, Q., Arnold, E., Ding, J. (2004): Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *J Biol Chem*, 279(32):33946-33957.

Yadav, A. K., Renfrow, J. J., Scholtens, D. M., Xie, H., Duran, G. E., Bredel, C., Vogel, H., Chandler, J. P., Chakravarti, A., Robe, P. A. *et al.* (2009): Monosomy of chromosome 10 associated with dysregulation of epidermal growth factor signaling in glioblastomas. *Jama*, 302(3):276-289.

Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J. *et al.* (2009): IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 360(8):765-773.

Zemanova, Z., Kramář, F., Babická, L., Randsdorfová, Š., Melicherčíková, J., Hrabal, P., Kozler, P., Michalová, K. (2006): Molecular cytogenetic stratification of recurrent oligodendrogliomas: utility of interphase fluorescence in situ hybridization (I-FISH). *Folia Biol*, 52:71-78.

Zhang, C., Moore, L. M., Li, X., Yung, W. A., Zhang, W. (2013): IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Neuro Oncol*, 15(9):1114-1126.

Zhang, Y., Xiong, Y., Yarbrough, W. G. (1998): "ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways." *Cell*, 92.6:725-734.