

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Lenka Čurnová**

**Cytogenetická a molekulárně biologická charakteristika astrocytárních nádorů**

Cytogenetic and molecular characterization of astrocytic tumours

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Aleš Vícha, Ph.D.

Praha 2015

**Prohlášení:**

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

V Praze, 28. 4. 2015

Lenka Čurnová

## Poděkování

Ráda bych poděkovala školiteli mé práce MUDr. Aleši Víchovi, Ph.D. za věnovaný čas, trpělivost, cenné rady a připomínky. Také děkuji rodině a všem, kdo mě podporovali při studiu.

## Abstrakt

Astrocytární nádory zahrnují heterogenní skupinu tumorů s rozdílnými histologickými znaky, jejichž diagnostika a zařazení do jednotlivých typů může být v některých případech obtížná. Vedle histologických znaků nádorové tkáně jsou zásadní charakteristikou genetické mutace v buňkách nádoru.

Podle histologického a klinického charakteru jsou nádory CNS rozdělovány do několika stupňů malignity. Astrocytomy nízkého stupně (*low-grade*) jsou nejběžnějšími solidními nádory u dětí. Malignější formy (především glioblastomy) naopak představují významnou skupinu nádorů CNS u dospělých pacientů. Mezi geny, které nesou v buňkách astrocytárních nádorů mutace, patří typicky *IDH1*, *TP53*, *EGFR*, *PTEN*. Převážně pilocytický astrocytomy jsou často spjaty s mutacemi v genu *BRAF*, který je součástí mitogeny aktivované protein kinázové (MAPK) dráhy.

K vyšetření mutací v genomu buněk nádorové tkáně slouží řada moderních metod. Mezi molekulární metody patří PCR, real-time PCR či sekvenování. Z cytogenetických metod založených na hybridizaci DNA jsou nejpoužívanější FISH a mikročipové technologie. V některých případech mohou být nádory zkoumány také pomocí imunologických metod.

Správná diagnostika nádoru a jeho zařazení do stupně malignity je zásadní pro stanovení prognózy a pro volbu následné léčby.

### Klíčová slova

astrocytární nádory, anaplastický astrocytom, difúzní astrocytom, pilocytický astrocytom, glioblastom, cytogenetické a molekulárně biologické metody

## **Abstract**

Astrocytic tumours include a heterogeneous group of tumours with different histological features. Their diagnostics and classification could be difficult in some cases. Besides histological features of the neoplastic tissue genetic mutations in the tumour cells are important for the basic characteristic of the tumours.

According to the histological and clinical characters tumours of the central nervous system are divided into several malignancy grades. Low-grade astrocytomas are the most common solid tumours of children. More malignant forms (mainly glioblastomas) represent a significant group of tumours of CNS of adult patients. *IDH1*, *TP53*, *EGFR*, *PTEN* typically belong among genes which carry mutations in the cells of astrocytic tumours. Mostly pilocytic astrocytomas are often connected with mutations of the *BRAF* gene which is a part of the mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway.

Many modern methods are used for the investigation of the mutations in the genome of the neoplastic tissue. PCR, real-time PCR and sequencing are the most important molecular methods. The most often used cytogenetic methods which are based on the hybridization of the DNA are FISH and microarray techniques. In some cases also immunological methods could be used.

The correct diagnostics of the tumour and its classification into the malignancy grade is essential for the prognosis assessment and for the choice of the subsequent therapy.

### **Key words**

astrocytic tumours, anaplastic astrocytoma, diffuse astrocytoma, pilocytic astrocytoma, glioblastoma, cytogenetic and molecular biological methods

# Obsah

Seznam zkratek	1
1. Úvod	3
2. Astrocyty	4
3. Klasifikace astrocytárních nádorů	4
3.1. Rozdělení podle WHO	4
3.2. Rozdíly mezi astrocytomy u dětí a dospělých	6
4. Charakteristika jednotlivých typů astrocytárních nádorů	8
4.1. Pilocytický astrocytom	8
4.2. Difúzní astrocytom	12
4.3. Anaplastický astrocytom	13
4.4. Glioblastom	14
4.5. Vzácnější typy astrocytomů	16
5. Metody využívané pro výzkum a diagnostiku astrocytárních nádorů	18
6. Závěr	23
Seznam použitých zdrojů	24

## Seznam zkratek

AA	anaplastický astrocytom
bp	páry bází
<i>BRAF</i>	gen pro serin-treoninovou protein kinázu B-Raf
CBTRUS	centrální registr mozkových nádorů v USA
CGH	komparativní genomová hybridizace
CNS	centrální nervová soustava
CT	výpočetní tomografie
DA	difúzní astrocytom
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
FISH	fluorescenční in-situ hybridizace
GBM	glioblastom
GCG	obrovskobuněčný glioblastom
GDP	guanosindifosfát
GLUT	glukózový přenašeč
GTP	guanosintrifosfát
HIF	faktor indukovaný hypoxií
IDH	isocitrát dehydrogenáza
IP3	inositol-3-fosfát
kbp	kilo páry (1000 párů) bází
LOH	ztráta heterozygoty
MAPK	mitogeny aktivované protein kinázy
MLPA	multiplexní na ligaci závislá polymerázová řetězová reakce
MR	magnetická rezonance
NADP+	nikotinamidadeninukleotid fosfát
NF1	neurofibromatóza typu 1, neurofibromin 1
NGS	sekvenování nové generace
p	krátké raménko chromozomu

PA	pilocytický astrocytom
PCR	polymerázová řetězová reakce
PET	pozitronová emisní tomografie
PIP2	fosfatidylinositol bisfosfát
PMA	pilomyxoidní astrocytom
PTEN	fosfatázový a tensinový homolog
PXA	pleomorfní xantoastrocytom
q	dlouhé raménko chromozomu
qPCR	real-time PCR (PCR v reálném čase)
RNA	ribonukleová kyselina
SEGA	subependymový obrovskobuněčný astrocytom
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
<i>TP53</i>	gen pro protein p53
WHO	světová zdravotnická organizace



# 1. Úvod

Astrocytární nádory jsou jednou z mnoha skupin nádorů, které postihují centrální nervovou soustavu. Patří mezi tumory odvozené od neuroepiteliální tkáně, které tvoří téměř 40 % všech nádorů CNS (Chen et al. 2013). Vznikají z astrocytů – gliových buněk, které zajišťují výživu neuronů a podílejí se na tvorbě hematoencefalické bariéry.

Přestože u dospělých pacientů nejsou nádory CNS příliš časté, u dětí je situace odlišná. Jedná se o nejčastější dětské solidní nádory a po leukémiích představují také druhou nejčastější příčinu smrti. Nejčtenější jsou astrocytomy (asi 7-8% všech nádorů u dětí). Vykazují značnou variabilitu z histologického i molekulárně genetického hlediska. Dělí se na dvě skupiny – *low-grade* a *high-grade*. U pacientů v dětském věku (0-19 let) jsou ze všech nádorů postihujících CNS nejběžnější *low-grade* astrocytomy, které zahrnují 30-50 % nádorů CNS. Z nich nejvýznamnější skupinu představují pilocytické astrocytomy. U dospělých se častěji vyskytují maligní formy, především glioblastomy, které představují 15,6% všech nádorů CNS (Ostrom et al. 2013).

Včasná a správná diagnóza nádoru je rozhodující pro určení vhodného postupu léčby. Vedle základních histologických postupů přispívá k odlišení jednotlivých typů astrocytárních nádorů molekulární a cytogenetická detekce genetických mutací DNA.

Cílem bakalářské práce je charakterizovat jednotlivé typy astrocytárních nádorů a shrnout jejich nejdůležitější genetické mutace, které mohou pomoci při diagnostice a prognostice astrocytomů. V práci jsou také popsány cytogenetické a molekulární metody, které slouží k detekci těchto mutací a mohou být využity v klinické praxi.

## 2. Astrocyty

Astrocytární nádory vznikají z astrocytů – jednoho typu gliových buněk přítomných v centrální nervové soustavě (CNS). Astrocyty jsou největší gliové buňky, mají rozvětvený tvar s mnohými výběžky. Dělí se do dvou typů. Plazmatické astrocyty se vyskytují v šedé hmotě CNS, mají mnoho výběžků. Jejich funkcí je výživa a také mechanická opora neuronů. Fibrilární astrocyty se vyskytují v bílé hmotě. Zde vyživují především axony neuronů. Astrocyty zprostředkovávají přenos látek mezi neurony a krví. Tím se podílejí na tvorbě hematoencefalické bariéry (Sofroniew a Vinters 2010).

Astrocyty také ovlivňují přenos signálu mezi neurony v synaptické štěrbině. Mohou se účastnit přímo přenosu signálů, protože stejně jako neurony mohou vylučovat některé neurotransmitery nebo naopak pomocí receptorů přijímat signál o jejich přítomnosti v extracelulárním prostoru. To u nich vyvolává krátkodobé zvýšení koncentrace vápníku. Astrocyty mohou být propojeny mezi sebou a tak jsou schopny si tento signál přenést a ovlivnit jiné synapse i na větší vzdálenost (Chváta 2010).

## 3. Klasifikace astrocytárních nádorů

### 3.1. Rozdělení podle WHO

Světová zdravotnická organizace (WHO) rozděluje nádory CNS do čtyř stupňů (grade), podle jejich histopatologického a klinického charakteru, především podle míry invazivity a rychlosti růstu. Zvyšující se číslo stupně ukazuje na vzrůstající maligní charakter nádoru. Pro zařazení nádorů do jednotlivých stupňů je používána řada hledisek, např. se posuzuje, zda-li buňky zachovávají svůj původní tvar, hodnotí se rychlost dělení, výskyt mitózy, nekrózy či proliferace cévního řečiště (Louis et al. 2007).

U mozkových gliomů se často používá rozřazení do dvou skupin – *low-grade* a *high-grade*. *Low-grade* gliomy (nádory nižšího stupně) zahrnují stupně I a II. Jsou to nádory, které obvykle rostou pomaleji a mají spíše benigní charakter. Oproti tomu stupně *high-grade* gliomy (nádory vyššího stupně) zahrnují nádory skupin III a IV, mají maligní charakter. Tyto

nádory mají obvykle horší prognózu a průběh onemocnění je velmi rychlý. Některé nádory II. stupně mají však tendenci přecházet do maligních forem, například difúzní astrocytom (Louis et al. 2007). Stupeň (grade) poukazuje na biologické chování nádoru a podle stanoveného stupně je dále určován způsob léčby, který se u jednotlivých nádorů velmi liší.

Podle WHO je rozeznáváno velké množství typů astrocytomů. Hlavními typy jsou pilocytický (pilocytární), difúzní, anaplastický astrocytom a glioblastomy. Dalšími, výrazně vzácnějšími typy jsou pilomyxoidní, subependymový obrovskobuněčný astrocytom a pleomorfní xantoastrocytom. U difúzního astrocytomu se rozlišuje několik typů (fibrilární, gemistocytární, protoplasmatický). Glioblastomy se rozdělují na primární a sekundární, i u nich můžeme rozlišit některé specifické typy (obrovskobuněčný glioblastom a gliosarkom). Mezi astrocytární nádory patří také gliomatóza mozku (Louis et al. 2007).

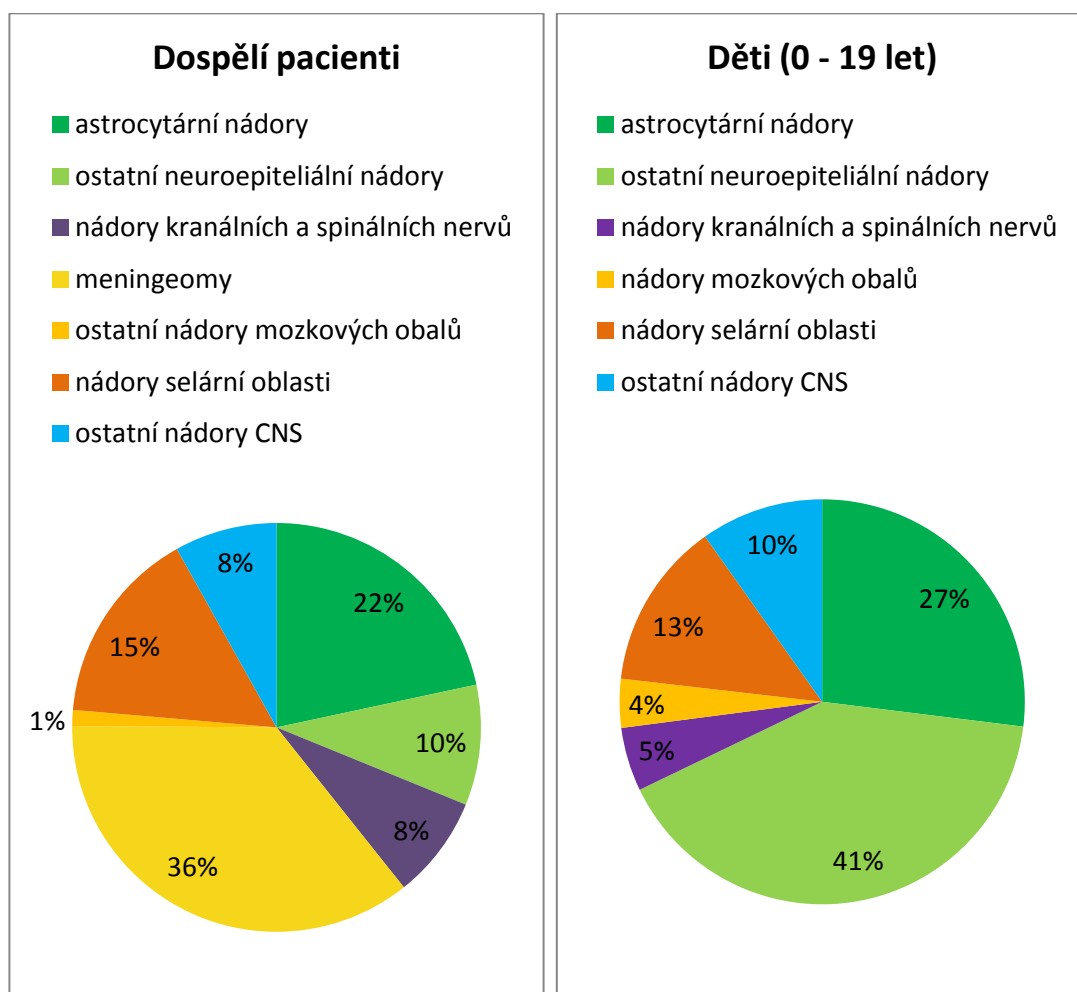
Jednotlivé typy nádorů se velmi liší histologicky i genetickými změnami a tudíž i z hlediska vhodné léčby. Pro správnou léčbu je klíčové zařazení nádoru do daného stupně. V tabulce 1 je podán přehled stupně malignity u jednotlivých typů astrocytárních nádorů.

<b>astrocytární nádor</b>	<b>stupeň malignity (grade)</b>
pilocytický astrocytom	I
subependymový obrovskobuněčný astrocytom	I
difúzní astrocytom	II
pilomyxoidní astrocytom	II
pleomorfní xantoastrocytom	II
anaplastický astrocytom	III
glioblastom (také obrovskobuněčný glioblastom a gliosarkom)	IV
gliomatóza mozku	III

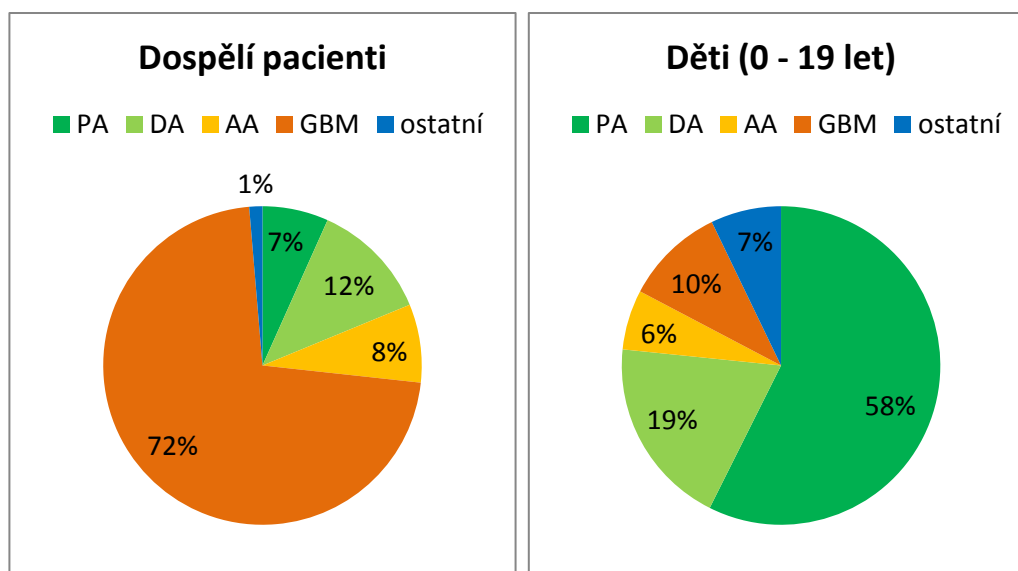
Tabulka 1: Přehled astrocytárních nádorů a jejich stupně malignity (podle: Louis et al. 2007).

### 3.2. Rozdíly mezi astrocytomy u dětí a dospělých

U dětí se nejčastěji vyskytují astrocytomy nižšího stupně. Zahrnují asi 30-50% všech nádorů centrální nervové soustavy (CNS). Jen zřídka přecházejí do maligních forem, na rozdíl od low-grade astrocytomů u dospělých, které vykazují mnohem agresivnější chování (Sievert a Fisher 2009). Naopak u dospělých převažují maligní formy astrocytárních nádorů, nejčastější jsou glioblastomy. Grafy 1 – 4 znázorňují četnost výskytu jednotlivých typů nádorů u dětí a u dospělých. Grafy vycházejí z dat databáze CBTRUS (Ostrom et al. 2013).



Grafy 1 a 2: Četnost výskytu jednotlivých skupin nádorů CNS u dospělých a u dětí.



Grafy 3 a 4: Četnost výskytu typů astrocytárních nádorů u dospělých a u dětí. PA – pilocytický astrocytom, DA – difúzní astrocytom, AA – anaplastický astrocytom, GBM - glioblastom

Rozdíly u některých typů astrocytomů mezi dětskými a dospělými pacienty jsou patrné i z hlediska genetických změn. Tabulka 2 ukazuje přehled nejčastějších astrocytomů a jejich genetických abnormalit a přibližnou četnost výskytu.

		děti	dospělí
pilocytický astrocytom	fúze genů <i>BRAF</i> a <i>KIAA1549</i>	60-80 %	vzácnější
	bodová mutace <i>V600E</i> v <i>BRAF</i>	okolo 10 %	časté
difúzní astrocytom	<i>IDH1</i> mutace	60-90 %	60-90 %
	<i>TP53</i> mutace	5-10 %	>70 % (53 %)
anaplastický astrocytom	<i>IDH1</i> mutace	60-90 %	60-90 %
	<i>TP53</i> mutace	okolo 20 %	>70 %
glioblastom primární	<i>EGFR</i> mutace	ojediné	30-40 %
	<i>TP53</i> mutace		<30 %
glioblastom sekundární	<i>IDH1</i> mutace	60-90 %	
	<i>TP53</i> mutace		>70 %

Tabulka 2: Genetické abnormality nejběžnějších typů astrocytomů u dětských a dospělých pacientů (Lee et al. 2013, Nikofova a Hamilton 2011, Rodriguez et al. 2013, Nakamura et al. 2007, Horbinski et al. 2013).

## 4. Charakteristika jednotlivých typů astrocytárních nádorů

### 4.1. Pilocytický astrocytom (PA)

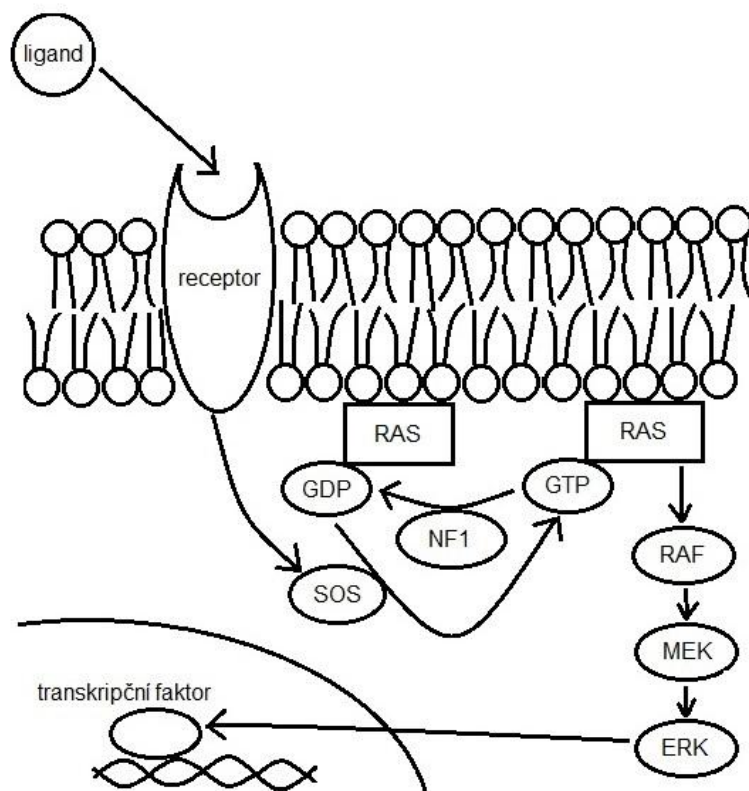
Pilocytické astrocytomy patří mezi low-grade gliomy. Podle WHO jsou zařazeny do stupně I (Louis et al. 2007). Jsou biologicky i klinicky odlišné od ostatních typů *low-grade* astrocytomů. Jedná se o dobře ohraničené, benigní nádory, které nemají tendenci se maligně zvrhávat. Obvykle mají velmi dobrou prognózu.

Jedná se o nejčastější nádory CNS u dětí. Většina PA je diagnostikována u lidí do 20-ti let, s maximálním výskytem u dětí ve věku 8 – 13 let. U lidí starších než 50 let se nachází jen velmi výjimečně (Bell et al. 2004). U dospělých také vykazují mnohem agresivnější chování (Theeler et al. 2014).

Mohou se v CNS nacházet na mnoha místech. Nejčastěji jsou lokalizovány v mozečku (Penman et al. 2015). Mohou se ale vyskytovat i v optických drahách, hemisférách koncového mozku, mozkovém kmeni, hypotalamu, chiasmatech nebo v míše (Stokland et al. 2010).

PA obvykle vykazují značnou histologickou variabilitu. Jsou přítomny kompaktní oblasti s bipolárními buňkami, které obsahují eosinofilní Rosenthalova vlákna, i více rozvolněné oblasti s výraznými mikrocystami (Chourmouzi et al. 2014).

Pilocytické astrocytomy se často vyznačují změnami mitogeny aktivované protein kinázové (MAPK) dráhy. MAPK dráha je signalizační kaskáda, která vede signál z membránového receptoru buňky až do jádra. Reguluje buněčný růst a proliferaci, diferenciaci, migraci, přežívání a apoptózu (Tatevossian et al. 2010). Je spouštěna aktivací receptorů pro růstové faktory. Signál je dále přenášen kaskádou kináz, které jsou aktivovány fosforylací a tím získávají schopnost fosforylovat další enzymy. Její součástí jsou kinázy z rodiny Ras, Raf, MEK a další (viz obrázek 1). Aktivace této dráhy vede k růstu, dělení a přežívání nádorových buněk (Sievert a Fisher 2009).



Obrázek 1: Změny MAPK dráhy v pilocytických astrocytomech (podle Tatevossian et al. 2010).

Tvorba pilocytických astrocytomů v optických drahách může být spojena s dědičným syndromem neurofibromatózou 1. Tento autosomálně dominantní syndrom je způsoben ztrátou funkce genu *NF1*. Gen *NF1* je lokalizován na 17. chromozomu, konkrétně 17q11.2 (Skuse et al. 1991). Mutace tumor supresorového genu ovlivňuje MAPK dráhu. Protein NF1 hydrolyzuje GTP na GDP, což vede k deaktivaci proteinu RAS (viz obrázek 1). Nefunkčnost genu *NF1* tudíž způsobuje hyperaktivaci proteinu RAS a tím také celé MAPK dráhy (See et al. 2012).

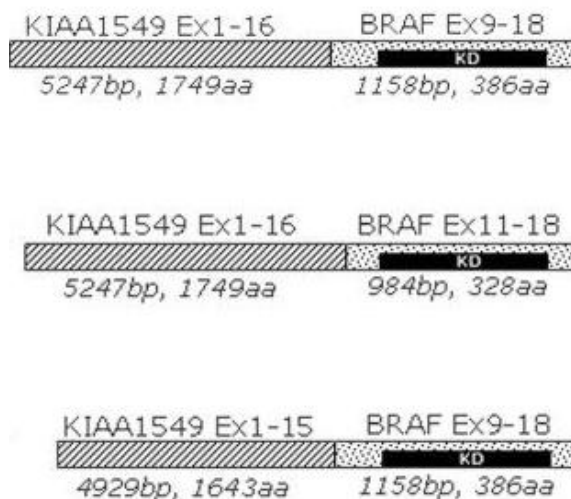
V buňkách PA bývá velmi často mutován gen pro serin-treoninovou protein kinázu B-Raf. Mutace způsobuje jeho hyperfunkci a následuje zvýšení aktivity MAPK dráhy (Jones et al. 2012). Gen pro kinázu B-Raf (*BRAF*) se řadí mezi onkogeny (geny, které řídí buněčný cyklus a jejich mutace vede ke zvýšené aktivitě, což může vyvolávat tvorbu nádorů). Nachází se na dlouhém raménku 7. chromozomu (konkrétně v úseku 7q34). Je velký přibližně 190 kbp a obsahuje 18 exonů (Jones et al. 2008).

Mutace v tomto genu jsou běžné, vyskytují se u celé řady nádorů – například u melanomů (Kudchadkar et al. 2012), v menší míře může být přítomna také u kolorektálního karcinomu (Thiel a Ristimäki 2013) a dalších.

Změny v genu *BRAF* mohou být různé, od bodové mutace až po větší genové přestavby. Bodové mutace se v dětských pilocytických astrocytomech vyskytují zřídka naopak u dospělých pacientů je tato mutace v astrocytomech nízkého stupně častější (Bannykh et al. 2014). Může se ale vyskytovat také u jiných typů astrocytomů. Bodové mutace genu *BRAF* jsou spjaty s exonem 15 (Sievert et al. 2009). Zde se vyskytuje katalytická doména. Pro správnou funkci proteinu je důležitá aminokyselina valin na 600. pozici (Yu et al. 2009). Nejčastější bodovou mutací v genu *BRAF* je substituce jedné báze (záměna thiminu za adenin), která vede k záměně valinu za kyselinu glutamovou (V600E) (Schiffman et al. 2010). Méně obvyklé mutace v tomto genu mohou být záměna valinu na 600. pozici za lysin nebo kyselinu asparagovou. V genu *BRAF* se může vyskytovat také inserce aminokyseliny, konkrétně například threonin na 599. pozici, což vede k posunu čtecího rámce (Jones et al. 2013).

Nejvýznamnější genovou aberací v pilocytických astrocytomech je duplikace části chromozomu 7, což vede k fúzi genu *BRAF* s genem *KIAA1549*. Gen *KIAA1549* je také umístěn na 7. chromozomu v oblasti 7q34. Je velký asi 150 kbp, obsahuje 20 exonů a jeho funkce zatím nebyla objasněna (Jones et al. 2008). Při fúzi těchto dvou genů dochází ke spojení počátečního úseku genu *KIAA1549* a koncové části genu *BRAF*, kdy *BRAF* ztrácí regulační N'koncovou doménu. Rozhraní mezi geny se ale může vyskytovat na více různých místech (Cruz et al. 2014). Nejčastěji se objevuje splynutí exonu 16 z genu *KIAA1549* a exonu 9 z genu *BRAF* (fúze 16/9). Další možnosti fúze jsou mezi exony 15/9 či 16/11 těchto genů. Velmi výjimečně se mohou objevit fúze i mezi jinými částmi těchto genů, například mezi exony 18/10 nebo 19/9 genů *KIAA1549* a *BRAF* (Tatevossian et al. 2010). Znázornění nejčastějších fúzí mezi geny *KIAA1549* a *BRAF* je uvedeno na obrázku 2.





Obrázek 2: Znárodnění nejčastějších typů fúze genů *KIAA1549* a *BRAF* (Jones et al. 2008).

Gen *BRAF* může vytvořit fúzi i s jinými geny. Tyto fúze ovšem nejsou tak běžné. Pro všechny alternativy je ale typická ztráta N'-koncové regulační oblasti genu *BRAF*. Mezi geny, které mohou vytvořit fúzi s genem *BRAF* patří geny *RNF130*, *CLCN6*, *MKRN1*, *GNAI1*, *FAM131B* (Jones et al. 2013).

MAP kinázová dráha u astrocytomů může být ovlivněna také jinými genetickými změnami, které nejsou ale tak časté. Jedná se například o bodové mutace v genu *KRAS* (Rodriguez et al. 2012).

## 4.2. Difúzní astrocytom (DA)

Difúzní astrocytomy jsou dle WHO řazeny do stupně II. Jedná se tedy také o nádory nižšího stupně (*low-grade*). Některé ale mohou postupně přecházet v maligní formy – v anaplastické astrocytomy a později v sekundární glioblastomy. Často jsou tedy předstupněm *high-grade* nádorů (Louis et al. 2007).

Postihují spíše starší pacienty, jen okolo 10% těchto nádorů je zaznamenáno u dětí mladších 20-ti let. V CNS se mohou vyskytovat kdekoli, ale nejčastěji se nachází v hemisférách koncového mozku (supratentoriálně, v hlubokých středočárových strukturách a v cervicomedulární oblasti) (Sievert a Fisher 2009).

Difúzní astrocytomy se vyznačují atypií jader, nízkým zastoupením mitóz a absencí nekróz a cévní proliferace (Bergthold et al. 2014).

S rozlišením difúzního astrocytomu od pilocytického astrocytomu bývá někdy problém, především, je-li nádor malý nebo je-li lokalizován v ne zcela typickém místě centrální nervové soustavy. Přitom rozlišení těchto dvou nádorů je zcela zásadní pro následnou léčbu. V diagnostice mohou pomoci molekulární metody, které odhalí genetické rozdíly mezi těmito typy astrocytomů (Korshunov et al. 2009).

Difúzní astrocytomy často obsahují mutaci v genu *IDH1*, který kóduje lidskou cytosolickou NADP+ dependentní isocitrát dehydrogenázu. Tento enzym katalyzuje oxidativní karboxylaci isocitrátu na  $\alpha$ -ketoglutarát. Výsledkem mutace je inaktivace isocitrát dehydrogenázy, což vede k oxidativnímu stresu a aktivaci faktoru indukujícímu hypoxii (*HIF1*) (Zhao et al. 2009). Gen *IDH1* se nachází na dlouhém raménku chromozomu 2, konkrétně v oblasti 2q33 (Horbinski 2013). Tato mutace je vždy bodová, ve 4. exonu genu, v kodónu 132. Nejčastější je záměna guaninu za adenin, která způsobuje záměnu aminokyseliny argininu za histidin (Yan et al. 2009). Výjimečně může být přítomna i jiná mutace, která způsobí například záměnu argininu za glycin nebo cystein (Korshunov et al. 2009, Camelo-Piragua 2011).

Výjimečně může být mutován také gen *IDH2*. Mutace se vyskytuje v kodónu 172 a jedná se nejčastěji o záměnu argininu za lysin (Camelo-Piragua 2011). Isocitrát dehydrogenáza 2 je lokalizována v mitochondriích, gen *IDH2* se nachází na chromozomu 15, v oblasti 15q26 (Horbinski 2013).

U difúzních astrocytomů se také poměrně často vyskytuje polysomie části 7. chromosomu (7q34). Na rozdíl od pilocytických astrocytomů ale dochází pouze ke zmnožení části DNA, fúze mezi geny *BRAF* a *KIAA1549* se u tohoto typu nádoru nevyskytuje. Naopak u pilocytických astrocytomů je fúze běžná, jak již bylo popsáno výše, a pouhé zmnožení úseku 7q34 bez fúze genů se vyskytuje poměrně vzácně (Korshunov et al. 2009).

### 4.3. Anaplastický astrocytom (AA)

Anaplastické astrocytomy jsou podle WHO zařazeny do stupně III. Jedná se o gliomy vyššího stupně, které mají maligní charakter (Louis et al. 2007). Mohou vznikat nově nebo se vyvíjí z anaplastických astrocytomů. Dále mohou přecházet v glioblastomy.

Vyskytují se hlavně u dospělých pacientů, u nichž jsou poměrně časté. Jejich prognóza je obvykle špatná (Stupp et al. 2007). Jsou lokalizovány nejvíce v hemisférách koncového mozku.

Anaplastické astrocytomy se vyznačují zvýšenou celularitou, přítomností mitóz a variabilním tvarem jádra (Wen a Kesari 2008).

Anaplastické astrocytomy vykazují mnoho genetických změn, ale většina z nich pro ně není unikátní. Často sdílí stejné znaky s dalšími high-grade astrocytomy. Mohou obsahovat mutaci v genu pro p53. Tato mutace je častější u starších pacientů, u dětí do šesti let se nevyskytuje vůbec. Dalšími mutacemi bývají například zvýšená amplifikace genu *EGFR* nebo delece na chromozomech 19q, 10q nebo 22q (Nakamura et al. 2007).

AA mohou obsahovat bodovou mutaci v genu *BRAF* (V600E). Přestože tato mutace bývá spjata spíše s astrocytomy nižšího stupně, u anaplastických astrocytomů dětí se však vyskytuje přibližně ve třetině případů (Schiffman et al. 2010).

Obvykle se objevuje také mutace v genech pro isocitrát dehydrogenázy, výrazně nejčastěji v genu *IDH1* (Yan et al. 2009).

Přechod *low-grade* astrocytomů k anaplastickým astrocytomům bývá provázen delecí části 9. chromozomu, kde je v oblasti 9q21 lokalizován tumor-supresorový gen *CDKN2A*. Tím dochází ke ztrátě heterozygoty tohoto genu (Schiffman et al. 2010).

#### 4.4. Glioblastom (GBM)

Glioblastomy jsou dle WHO zařazeny do IV. stupně (Louis et al. 2007). Jsou to nejběžnější nádory neuroepitelové tkáně u dospělých pacientů, představují 15,6% nádorů, které se mohou vyskytovat v CNS (Ostrom et al. 2013). Jsou maligní, agresivní, průběh onemocnění je velmi rychlý a mají špatnou prognózu. Většina pacientů umírá do jednoho roku od zjištění nádoru (Ohgaki a Kleihues 2007). Průměrně přežívají pacienti s diagnostikovaným glioblastomem jen 12-15 měsíců a jen méně než 20% jich přežije déle než dva roky (Wen a Kesari 2008, Rao et al. 2014). Mladší pacienti mají obvykle lepší prognózu.

Glioblastomy se dělí na dvě skupiny – primární a sekundární (Peiffer a Kleihues 1999). Častějším typem jsou primární (více než 90 %). Vznikají nově, bez toho, že by jim předcházela nálezn nějakého jiného, méně maligního nádoru. Na druhou stranu sekundární glioblastomy vznikají z difúzního nebo anaplastického astrocytomy. Primární glioblastomy jsou častější u starších lidí, vzácnější sekundární se vyskytují u mladších pacientů. Pro rozlišení jsou nejdůležitější mutace v genech *EGFR*, *PTEN* a *TP53* (Ohgaki a Kleihues 2007).

Nachází se obvykle v hemisférách koncového mozku, u dětí občas také v mozkovém kmeni.

Nádorová tkáň glioblastomu je polymorfni, obsahuje buňky s výraznou mitotickou aktivitou. Jsou přítomny nekrózy a proliferace cévního řečiště.

Primární glioblastomy vznikají rovnou z astrocytů, nepředchází jim jiné stádium nádoru. Objevují se hlavně u starších lidí (nejčastěji ve věkové skupině 65 – 85 let), průměrný věk pacientů při diagnostice glioblastomů je 64 let (Ostrom et al. 2013).

Typicky vykazují zvýšenou expresi genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (*EGFR*) a mutaci v genu *PTEN*. Tyto geny hrají důležitou roli v signalizační kaskádě vedoucí k růstu a přežití nádorových buněk. Začíná navázáním růstového faktoru na extracelulární doménu receptoru, což vede k aktivaci enzymu PI3K, který způsobuje vznik druhého posla IP3 (inositol-3-fosfát) z PIP2 (fosfatidylinositol bisfosfát). IP3 spouští kinázovou dráhu, která vede k buněčné proliferaci a přežívání buňky pomocí zablokování apoptózy. Je-li v buňce nadměrně exprimován gen *EGFR*, obsahuje buňka více receptorů pro růstový faktor, což vede k častějšímu navázání růstového faktoru a tato dráha je spouštěna

častěji. Gen *PTEN* kóduje protein tyrosin fosfatázu, která ve zdravé buňce reguluje tuto dráhu pomocí blokace IP3 (Ohgaki a Kleihues 2007). Gen *EGFR* je lokalizován na 7. chromozomu, v oblasti 7p12. Zvýšená exprese tohoto genu je přítomna asi u poloviny primárních glioblastomů (Shinojima et al. 2003). Gen *PTEN* se vyskytuje na dlouhém raménku 10. chromozomu (konkrétně v oblasti 10q23) a je mutován, čímž ztrácí svoji funkci, asi u 30 % glioblastomů (Li et al. 1997).

Primární glioblastomy mohou obsahovat také mutaci v genu *MDM2*. Tento gen leží na dlouhém raménku chromozomu 12 (12q) a kóduje protein, který inhibuje funkci proteinu p53. U primárních GBM se většinou vyskytuje tato mutace, zatímco sekundární GBM obsahují výrazně častěji mutaci v genu *TP53* (Biernat et al. 1997).

Sekundární glioblastomy nevznikají nově, ale vyvíjí se z jiného nádoru – difúzního nebo anaplastického astrocytomy. Jsou méně časté, ale u dětí se vyskytují výrazně častěji.

Pro tyto nádory je typická mutace v genu *TP53*, který kóduje protein p53. Tento tumor-supresorový gen je lokalizován na krátkém raménku 17. chromozomu, konkrétně v oblasti 17p13 (Isobe et al. 1986). Protein p53 hraje důležitou roli v mnoha buněčných procesech, které ovlivňují opravy DNA, buněčnou diferenciaci či apoptózu. Je aktivován po poškození DNA a slouží jako transkripční faktor a aktivuje další geny, např. gen pro protein p21. Mutace v tomto genu je nejčastěji v kodónu 248 a 273. Deaminace cytosinu vede k výměně nukleotidového páru G-C za A-T, čímž gen ztrácí svoji funkci (Ohgaki et al. 2004).

Sekundární glioblastomy také obsahují mutaci v genu *IDH1* výrazně častěji než primární. To je spjato zároveň i s nižším věkem pacientů (okolo třiceti let). Mutace se projevuje záměnou aminokyseliny na 132. pozici proteinu isocitrát dehydrogenázy (R132H). Pacienti, u kterých se vyskytuje mutace v genu *IDH1* mají výrazně lepší prognózu, průměrně mohou přežít okolo čtyř let (Parsons et al. 2008).

Zvýšená exprese genu pro EGFR je častější u pacientů vyššího věku. U dětí se vyskytuje spíše ojediněle. Naopak i primární glioblastomy u dětí občas obsahují mutaci genu *TP53*. To poukazuje na fakt, že dětské glioblastomy jsou na genové úrovni podobnější sekundárním glioblastomům u dospělých (Nakamura et al. 2007).

Glioblastomy také produkují výrazně více transkripčního faktoru odpovídajícího na hypoxii v buňce (HIF). Oproti nenádorovým buňkám mají stejně jako všechny maligní tumory zvýšenou potřebu kyslíku. Také mají vyšší potřebu glukózy, a proto se v jejich cytoplazmatické membráně nachází více glukózových přenašečů (GLUT-1). Exprese těchto faktorů je výrazně vyšší u glioblastomů než u podobných anaplastických astrocytomů, které tyto faktory téměř nevytvářejí (Mayer et al. 2012).

Další častou změnou v glioblastomech bývá delece na jednom z homologních chromozomů, což vede ke ztrátě heterozygosity (LOH). Nejčastější LOH, objevující se u primárních i sekundárních glioblastomů, je delece na dlouhém raménku 10. chromozomu. Zde se vyskytuje komplex tumor-supresorových genů (Ohgaki et al. 2004, Fujisawa et al. 2000). Dále se mohou vyskytovat delece na 1p, 10p, 13q, 19q, 22q. Tyto delece však mohou být přítomny i u jiných maligních astrocytomů (Ohgaki a Kleihues 2007, Nakamura et al. 2007).

## **4.5. Vzácnější typy astrocytomů**

### **Pilomyxoidní astrocytom (PMA)**

Tento typ astrocytárního nádoru je velmi podobný pilocytickému astrocytomu, ale řadí se dle WHO do stupně II. Od pilocytického astrocytomu byl odlišen nedávno, popsán byl až koncem 20. století. Je agresivnější, více maligní a mívá horší prognózu. Vyskytuje se u kojenců nebo malých dětí (Louis et al. 2007).

Jsou monomorfní, s bipolárními buňkami a na rozdíl od PA nemívají Rosenthalova vlákna a eosinofilní granula (Tihan et al. 1999). Nejčastěji se nachází v hypotalamu, očním chiazmatu nebo okolo třetí mozkové komory (Rodriguez et al. 2013).

### **Pleomorfní xantoastrocytom (PXA)**

Pleomorfní xantoastrocytom se řadí podle WHO také do II. stupně, prognóza u nich bývá příznivá (Louis et al. 2007). Obvykle se vyskytuje u dospívajících a mladých dospělých (Rodriguez et al. 2013), ale může se objevit také u starších lidí (Dias-Santagata et al. 2011).

Jedná se o dobře ohraničený nádor, který je histologicky polymorfní. Obsahuje vřetenovité buňky a velké buňky s atypickým jádrem. Mitózy i nekrózy mohou být přítomny (Lim et al. 2013). Některé PXA mohou vykazovat také anaplastické znaky.

PXA často obsahují bodovou mutaci v genu *BRAF*, konkrétně V600E (Ida et al. 2013). Tato mutace je přítomna přibližně u dvou třetin PXA (Schindler 2011).

Asi u tří čtvrtin PXA se objevuje také exprese antigenu CD34, který se normálně vyskytuje v endoteliálních buňkách (Reifenberger et al. 2003).

### **Subependymový obrovskobuněčný astrocytom (SEGA)**

Tento nádor je benigní, podle WHO je zařazen do stupně I (Louis et al. 2007).

Bývá spojen s tuberózní sklerózou (Rodriguez et al. 2013). Toto autozomálně dominantní onemocnění se projevuje četnými benigními nádory a je spojeno s mutacemi v tumorsupresorových genech *TSC1*, umístěném na chromozomu 9, a *TSC2* lokalizovaném na chromozomu 16 (Schwartz et al. 2007).

### **Obrovskobuněčný glioblastom (GCG)**

Obrovskobuněčný glioblastom je jednou z vzácných variant glioblastomu. Je také zařazen podle WHO do stupně IV a má špatnou prognózu (Louis et al. 2007). GCG představují asi 1 % ze všech glioblastomů (Kozak a Moody, 2009).

Tento typ nádoru se vyskytuje hlavně v hemisférách koncového mozku (Karremann et al. 2009)

## 5. Metody využívané pro výzkum a diagnostiku astrocytárních nádorů

Při stanovování diagnózy nádoru je používáno mnoho hledisek. Důležitou roli hrají klasické klinické vyšetřovací metody – výpočetní tomografie (CT), magnetická rezonance (MR), pozitronová emisní tomografie (PET) (Balyasnikova et al. 2012). Dále je nutná biopsie části nádorové tkáně a vyšetření pomocí histologických metod.

V poslední době jsou na vzestupu také další laboratorní vyšetřovací metody – cytogenetické a molekulární. Jsou používány ke zjišťování genetických změn a mutací, čímž přispívají ke stanovení přesnější diagnózy a prognózy onemocnění.

### PCR

Jednou z nejvíce využívaných technik molekulární biologie je PCR (polymerázová řetězová reakce). Je založená na principu replikace DNA, kdy dochází k mnohonásobnému zmnožení konkrétního úseku za použití specifických primerů (Korshunov et al. 2009, Schiffman et al. 2010). Samotné PCR musí předcházet izolace DNA z buněk. PCR se skládá ze tří kroků, které se mnohokrát cyklicky opakují. Každý krok potřebuje specifickou teplotu. V prvním kroku (obvykle při teplotě 95 C) dochází k denaturaci dvou vláken DNA od sebe. Ve druhém kroku dochází k nasednutí primerů. Teplota je specifická vždy pro konkrétní primery, ale je z celého cyklu nejnižší. Třetím krokem je samotná replikace pomocí DNA-polymerázy. Teplota se pohybuje okolo 72 C.

Někdy je nutné získat produkt PCR se stejnou sekvencí jako by byla mRNA po posttranskripčních úpravách. V takovém případě se izoluje z buňky RNA, která je následně převedena reverzní transkripcí do DNA a dále už je postup PCR stejný.

Výsledek PCR může být zobrazen pomocí gelové elektroforézy nebo použit pro následnou sekvenaci.

PCR se využívá k namnožení konkrétní části DNA, ve které je očekávána mutace. Příkladem je bodová mutace v genu *IDH1* (Korshunov et al. 2009) nebo produkt po fúzi genů *BRAF* a *KIAA1549* (Schiffman et al. 2010). Používají se specifické primery, které umožňují detekovat mutaci a pro kontrolní reakci primery detekující nemutovanou DNA.



## Real-time PCR

Při real-time PCR (PCR v reálném čase) se v reakci používají navíc ještě fluorescenčně značené próby, které se specificky vážou na replikovaný úsek DNA (Tian et al. 2011). Fluorescenční signál je možné detekovat a pozorovat, kdy dochází k jeho exponenciálnímu nárůstu, což značí zvýšení počtu kopií daného úseku DNA nad pozorovatelnou mez.

Metoda real-time PCR může být použita také ke zjištění fúzního produktu genů *BRAF* a *KIAA1549* (Tian et al. 2011), dále například pro detekci bodové mutace v genu *BRAF* nebo pro detekci exprese genu *EGFR* (Nakamura et al. 2007).

## Sekvenování

Sekvenování se používá v případě, pokud je potřeba zjistit přesnou sekvenci konkrétního úseku genu, především z důvodu bodové mutace (Korshunov et al. 2009, Laviv et al. 2012). Nejčastěji je používáno sekvenování Sangerova typu, které je založeno na principu řízené terminace syntézy DNA. Reakční směs ale vždy obsahuje radioaktivně nebo neradioaktivně značené primery či terminátory a navíc ještě jeden ze čtyř typů dideoxynukleotidů. Tímto dideoxynukleotidem je řetězec nově vznikajícího vlákna DNA ukončen. V reakci tak vznikají různě dlouhé řetězce DNA. Pro každý ze čtyř různých dideoxynukleotidů musí být udělána vlastní reakce. Po vizualizaci DNA pomocí elektroforézy a porovnání 4 reakcí s různými typy dideoxynukleotidů lze stanovit pořadí bází v DNA.

V posledních letech dochází k rozvoji sekvenování nové generace (NGS), které umožňuje rychlejší a přesnější sekvenaci velkých úseků DNA i celých genomů.

Sekvenování se používá například ke zjištění bodové mutace v genu *BRAF* (Laviv et al. 2012, Yu et al. 2009) nebo v genech pro isocitrát dehydrogenázu *IDH1* a *IDH2* (Horbinski et al. 2010, Korshunov et al. 2009).

### **Analýza křivek tání**

Zjišťovat přítomnost mutace v genu lze také na základě rozdílné teploty tání úseků DNA s mutací a bez mutace (Horbinski et al. 2010). V tomto případě je prováděna real-time PCR se specifickými primery a fluorescenčně značenými próbami a následné graduální zvyšování teploty. Během zvyšování teploty dochází k denaturaci DNA. Teplota, při které je denaturována právě polovina DNA, je označována jako teplota tání.

Tato metoda může být použita pro detekci bodové mutace v genu *IDH1* nebo *IDH2* (Horbinski et al. 2010).

### **Hmotnostní spektrofotometrie**

Mutace v genu může být zkoumána také pomocí hmotnostní spektrometrie. Amplifikací požadovaného úseku DNA pomocí specifických primerů a následné hybridizace a terminace, které jsou závislé na sekvenci, vzniknou různé produkty pro mutovanou a pro normální alelu. Tyto produkty se liší svojí hmotností a mohou být zkoumány hmotnostním spektrometrem (Laviv et al. 2012).

Tato metoda může být využita pro zjištění mutace v genu *BRAF* (Laviv et al. 2012).

### **Fluorescenční in-situ hybridizace (FISH)**

Tato cytologická metoda slouží k zobrazení vyšetřovaného úseku DNA. Jsou používány specifické barevně značené próby, které se vážou na konkrétní úsek DNA v buňce (Camelo-Piragua et al. 2011). Poté je možné pod mikroskopem pozorovat barevné signály. Může být použito více různých barev, jejichž signál se může skombinovat, pokud se úseky DNA s navázanými próbami nachází těsně u sebe. Pomocí FISH mohou být zobrazeny translokace, delece či amplifikace konkrétních úseků DNA.

Metoda FISH je používána například pro zjištění fúze genů *BRAF* a *KIAA1549* v případě PA (Korshunov et al. 2009) nebo k detekci amplifikace genu *EGFR* (Camelo-Piragua et al. 2011).

## Array CGH

Komparativní genomová hybridizace na čipu je molekulárně cytogenetická metoda, která umožňuje analýzu změn počtu kopií úseku genu. Porovnává vyšetřovanou a kontrolní DNA. Je založená na hybridizaci úseků zkoumané DNA na čip (array). Na čipu jsou umístěné specifické krátké sekvence jednovláknové DNA (sondy). Na ně se současně vážou naamplifikované krátké fragmenty fluorescenčně značené vyšetřované DNA získané z buňky a kontrolní DNA, která je značená jinou barvou. Po navázání DNA na čip je vyhodnocován barevný signál a podle něho je určeno, která DNA byla na konkrétní místo na čipu navázána (Tian et al. 2011).

Metodou CGH je možné detekovat amplifikaci či delecii určitého genu. Mikročipová technologie CGH může být použita například ke zjištění fúzního produktu genů *BRAF* a *KIAA1549* (Tian et al. 2011).

## Array SNP

Metoda SNP array spočívá v detekci jednonukleotidových polymorfismů v genomu. I zde se využívají čipy s navázanými sondami, které hybridizují s amplifikovanými fragmenty zkoumané DNA. Poté následuje promývání čipu a na čipu zůstanou navázány pouze části DNA, které jsou přesně komplementární k sondě. Nakonec je čip skenován a vyhodnocen. Metoda podobně jako array CGH umožňuje průkaz pouze nebalancovaných změn (Vosecká et al. 2014).

Touto metodou mohou být prokázány ztráty heterozygosity, například LOH u částí chromozómů 1p, 10p, 19q u glioblastomů. Může být ale použita také k analýze mutací v genech *TP53*, *IDH1*, *IDH2* (Camelo-Piragua et al. 2011) nebo bodové mutace v genu *BRAF* (Dias-Santagata et al. 2011).

## **MLPA**

Touto metodou mohou být zkoumány nebalancované změny v genomu buněk. Je založena na hybridizaci DNA a specifických krátkých sond. Po hybridizaci se spojí oligonukleotidy tvořící sondu a amplifikují se pomocí PCR. Výsledné různě dlouhé úseky se rozdělí kapilární elektroforézou a analyzují (Bunyan et al. 2004).

MLPA může být použita k detekci bodové mutace v genech *BRAF* nebo *IDH*.

## **Imunohistochemické metody**

Nádory mohou být zkoumány také pomocí protilátek, které detekují zvýšenou expresi určitého genu nebo mutantní protein (Lee et al. 2013, Mayer et al. 2012). Může být použita také metoda Western blotu, která spočívá v rozdělení jednotlivých proteinů gelovou elektroforézou, přenesení na membránu a detekci specifickými protilátkami (Capper et al. 2010).

Imunohistochemická vyšetření jsou používána například pro detekci mutantních genů *TP53*, *EGFR*, *IDH1* (Lee et al. 2013) nebo GLUT-1 a HIF (Mayer et al. 2012).

## 6. Závěr

Astrocytární nádory představují významnou skupinu tumorů, především u dětí. V buňkách nádorové tkáně se vyskytuje mnoho specifických genetických mutací, jejichž identifikace přispívá k upřesnění diagnózy onemocnění. Správná a včasná diagnostika určitého typu nádoru umožňuje zvolit nejvhodnější léčbu. K vyšetření jsou používány molekulární a cytogenetické metody.

Z hlediska léčby je důležité odlišit čistě benigní pilocytický astrocytom od ostatních *low-grade* astrocytomů. K tomu může sloužit vyšetření fúze genů *BRAF* a *KIAA1549*, která je pro pilocytické astrocytomy typická a u jiných typů astrocytárních nádorů se nevyskytuje. Pro porovnání může být použita také detekce bodové mutace v genu *IDH1* nebo v genu *BRAF*. Pro pilocytický astrocytom může být zvolena mírnější léčba, která by pro malignější typy astrocytomů nebyla dostatečná. S ohledem na většinou nízký věk pacientů je ale vhodnější zvolit méně agresivní léčbu, pokud je dostačující.

Pro diagnostiku maligních forem astrocytárních nádorů (*high-grade*) jsou typické mutace v genech *TP53*, *EGFR* a *PTEN*. V glioblastomech se také často vyskytují delece, které způsobují ztrátu heterozygosity genů. Mohou se vyskytovat na mnoha místech v genomu. Průběh onemocnění maligními nádory CNS bývá velmi rychlý a je nutné zvolit co nejúčinnější léčbu. Je proto důležité diagnostikovat nádor přesně a co nejrychleji.

Využití molekulárních a cytogenetických metod k analýze genetických mutací umožňuje rozlišení jednotlivých typů astrocytárních nádorů a jejich zařazení do stupně malignity, což přispívá k přesnějšímu stanovení prognózy a volbě terapie.

## Seznam použitých zdrojů

Balyasnikova, S., Löfgren, J., de Nijs, R., Zamogilnaya, Y., Højgaard, L., Fischer, B. M. (2012). PET/MR in oncology: an introduction with focus on MR and future perspectives for hybrid imaging. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2(4), 458–474.

Bannykh, S. I., Mirocha, J., Nuno, M., Lopategui, J., Kandala, G. (2014) V600E BRAF mutation in pilocytic astrocytoma is associated with a more diffuse growth pattern but does not confer a more aggressive clinical behavior. *Clinical Neuropathology*, 33(6), 388-398. doi:10.5414/NP300753.

Bell, D., Chitnavis, B. P., Al-Sarraj, S., Connor, S., Sharr, M. M., Gullan, R. W. (2004). Pilocytic astrocytoma of the adult – clinical features, radiological features and management. *British Journal of Neurosurgery*, 18(6), 613-616.

Bergthold, G., Bandopadhyay, P., Bi, W. L., Ramkissoon, L., Stiles, C., Beroukhim, R., et al. (2014). Pediatric low-grade gliomas: How modern biology reshapes the clinical field. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1845(2), 294–307. doi:10.1016/j.bbcan.2014.02.004.

Biernat, W., Kleihues, P., Yonekawa, Y., Ohgaki, H. (1997). Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 56(2), 180-185.

Bunyan, D. J., Eccles, D. M., Sillibourne, J., Wilkins, E., Thomas, N. S., Shea-Simonds, J., et al. (2004). Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *British Journal of Cancer*, 91(6), 1155–1159. doi:10.1038/sj.bjc.6602121.

Camelo-Piragua, S., Jansen, M., Ganguly, A., Kim, J. C., Cospers, A. K., Dias-Santagata, D., et al. (2011). A Sensitive and Specific Diagnostic Panel to Distinguish Diffuse Astrocytoma from Astrocytosis: Chromosome 7 Gain with Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 and p53. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70(2), 110–115. doi:10.1097/NEN.0b013e31820565f9.

Capper, D., Weissert, S., Balss, J., Habel, A., Meyer, J., Jäger, D., Ackermann, U., Tessmer, C., Korshunov, A., Zentgraf, H., Hartmann, C., von Deimling, A. (2010). Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 20(1), 245-254. doi: 10.1111/j.1750-3639.2009.00352.x.

Cruz, G. R., Dias Oliveira, I., Moraes, L., Del Giudice Paniago, M., de Seixas Alves, M. T., Capellano A. M., Saba-Silva, N., Cavalheiro, S., Cerutti, J. M., Toledo, S. R. (2014). Analysis of KIAA1549-BRAF fusion gene expression and IDH1/IDH2 mutations in low grade pediatric astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 117(2), 235-242. doi: 10.1007/s11060-014-1398-1.

Dias-Santagata, D., Lam, Q., Vernovsky, K., Vena, N., Lennerz, J. K., Borger, D. R., et al. (2011). BRAF V600E Mutations Are Common in Pleomorphic Xanthoastrocytoma: Diagnostic and Therapeutic Implications. *PLoS ONE*, 6(3), e17948. doi:10.1371/journal.pone.0017948.

Fujisawa, H., Reis, R. M., Nakamura, M., Colella, S., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Laboratory Investigation*, 80(1), 65-72.

Horbinski, C. (2013). What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathologica*, 125(5), 621–636. doi:10.1007/s00401-013-1106-9.

Horbinski, C., Kelly, L., Nikiforov, Y. E., Durso, M. B., & Nikiforova, M. N. (2010). Detection of *IDH1* and *IDH2* Mutations by Fluorescence Melting Curve Analysis as a Diagnostic Tool for Brain Biopsies. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 12(4), 487–492. doi:10.2353/jmoldx.2010.090228.

Chen, L., Zou, X., Wang, Y., Mao, Y., Zhou, L. (2013). Central nervous system tumors: a single center pathology review of 34,140 cases over 60 years. *BMC Clinical Pathology*, 13, 14. doi:10.1186/1472-6890-13-14.

Chourmouzi, D., Papadopoulou, E., Konstantinidis, M., Syrris, V., Kouskouras, K., Haritanti, A., et al. (2014). Manifestations of pilocytic astrocytoma: a pictorial review. *Insights into Imaging*, 5(3), 387–402. doi:10.1007/s13244-014-0328-2.

Chvátal, A. (2010). Gliové buňky a jejich úloha v mozku. *Sanquis č.84/2010*, 88.

Ida, C. M., Vrana, J. A., Rodriguez, F. J., Jentoft, M. E., Caron, A. A., Jenkins, S. M., Giannini, C. (2013). Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for detection of *BRAF* V600E mutation in pleomorphic xanthoastrocytoma. *Acta Neuropathologica Communications*, 1, 20. doi:10.1186/2051-5960-1-20.

Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M., Croce, C. M. (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320(6057), 84-85.

Jones, D. T. W., Gronych, J., Lichter, P., Witt, O., Pfister, S. M. (2012). MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(11), 1799–1811. doi:10.1007/s00018-011-0898-9.

Jones, D. T. W., Hutter, B., Jäger, N., Korshunov, A., Kool, M., Warnatz, H.-J., et al. (2013). Recurrent somatic alterations of *FGFR1* and *NTRK2* in pilocytic astrocytoma. *Nature Genetics*, 45(8), 927–932. doi:10.1038/ng.2682.

Jones, D. T. W., 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 Research*, 68(21), 8673–8677. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2097.

Karremann, M., Butenhoff, S., Rausche, U., Pietsch, T., Wolff, J. E. A., Kramm, C. M. (2009). Pediatric giant cell glioblastoma: New insights into a rare tumor entity. *Neuro-Oncology*, 11(3), 323–329. doi:10.1215/15228517-2008-099.

- Korshunov, A., Meyer, J., Capper, D., Christians, A., Remke, M., Witt, H., et al. (2009). Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. *Acta Neuropathologica* 118(3), 401–405. doi:10.1007/s00401-009-0550-z.
- Kozak, K. R., Moody, J. S. (2009). Giant cell glioblastoma: A glioblastoma subtype with distinct epidemiology and superior prognosis. *Neuro-Oncology*, 11(6), 833–841. doi:10.1215/15228517-2008-123.
- Kudchadkar, R., Paraiso, K. H. T., Smalley, K. S. M. (2012). Targeting Mutant *BRAF* in Melanoma: Current Status and Future Development of Combination Therapy Strategies. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 18(2), 124–131. doi:10.1097/PPO.0b013e31824b436e.
- Laviv, Y., Toledano, H., Michowiz, S., Dratviman-Storobinsky, O., Turm, Y., Fichman-Horn, S., et al. (2012). BRAF, GNAQ, and GNA11 mutations and copy number in pediatric low-grade glioma. *FEBS Open Bio*, 2, 129–134. doi:10.1016/j.fob.2012.05.004.
- Lee, K. S., Choe, G., Nam, K. H., Seo, A. N., Yun, S., Kim, K. J., et al. (2013). Immunohistochemical Classification of Primary and Secondary Glioblastomas. *Korean Journal of Pathology*, 47(6), 541–548. doi:10.4132/KoreanJPathol.2013.47.6.541.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., Parsons, R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 257(5308), 1943-1947.
- Lim, S., Kim, J. H., Kim, S. A., Park, E. S., Ra, Y. S., Kim, C. J. (2013). Prognostic Factors and Therapeutic Outcomes in 22 Patients with Pleomorphic Xanthoastrocytoma. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 53(5), 281–287. doi:10.3340/jkns.2013.53.5.281.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., et al. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97–109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4.
- Mayer, A., Schneider, F., Vaupel, P., Sommer, C., Schmidberger, H. (2012). Differential expression of HIF-1 in glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *International Journal of Oncology*, 41(4), 1260–1270. doi:10.3892/ijo.2012.1555.
- Nakamura, M., Shimada, K., Ishida, E., Higuchi, T., Nakase, H., Sakaki, T., Konishi, N. (2007). Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors. *Neuro-Oncology*, 9(2), 113–123. doi:10.1215/15228517-2006-036.
- Nikiforova, M. N. and Hamilton, R. L. (2011). Molecular diagnostics of gliomas. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 135(5), 558-568. doi: 10.1043/2010-0649-RAIR.1.



Ohgaki, H., Kleihues, P. (2007). Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology*, 170(5), 1445–1453. doi:10.2353/ajpath.2007.070011.

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., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M. G., Lütolf, U. M., Kleihues, P. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Research*, 64(19), 6892-6899.

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., et al. (2013). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*, 15(Suppl 2), ii1–ii56. doi:10.1093/neuonc/not151.

Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., et al. (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5897), 1807. doi:10.1126/science.1164382.

Peiffer, J., Kleihues, P. (1999). Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 9(2), 241-245.

Penman, C. L., Faulkner, C., Lowis, S. P., Kurian, K. M. (2015). Current Understanding of BRAF Alterations in Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Targeting in Pediatric Low-Grade Gliomas. *Frontiers in Oncology*, 5, 54. doi:10.3389/fonc.2015.00054.

Rao, S. A. M., Srinivasan, S., Patric, I. R. P., Hegde, A. S., Chandramouli, B. A., Arimappamagan, A., et al. (2014). A 16-Gene Signature Distinguishes Anaplastic Astrocytoma from Glioblastoma. *PLoS ONE*, 9(1), e85200. doi:10.1371/journal.pone.0085200.

Reifenberger, G., Kaulich, K., Wiestler, O. D., Blumcke, I. (2003). Expression of the CD34 antigen in pleomorphic xanthoastrocytomas. *Acta Neuropathologica*, 105, 358–364.

Rodriguez, F. J., Lim, K. S., Bowers, D., Eberhart, C. G. (2013). Pathological and Molecular Advances in Pediatric Low Grade Astrocytoma. *Annual Review of Pathology*, 8, 361–379. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164009.

See, W. L., Tan, I.-L., Mukherjee, J., Nicolaidis, T., Pieper, R. O. (2012). Sensitivity of Glioblastomas to Clinically Available MEK Inhibitors Is Defined by Neurofibromin 1 Deficiency. *Cancer Research*, 72(13), 3350–3359. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0334.

Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J., Oka, K., Ishimaru, Y., Ushio, Y. (2003). Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Research*, 63(20), 6962-6970.

Schiffman, J. D., Hodgson, J. G., Vandenberg, S. R., Flaherty, P., Polley, M.-Y. C., Yu, M., et al. (2010). Combined Oncogenic *BRAF* Mutation and *CDKN2A* Inactivation Is Characteristic of a Subset of

Pediatric Malignant Astrocytomas. *Cancer Research*, 70(2), 512–519. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1851.

Schindler, G., Capper, D., Meyer, J., Janzarik, W., Omran, H., Herold-Mende, C., Schmieder, K., Wesseling, P., Mawrin, C., Hasselblatt, M., Louis, D. N., Korshunov, A., Pfister, S., Hartmann, C., Paulus, W., Reifenberger, G., von Deimling, A. (2011). Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathologica*, 121(3), 397-405. doi: 10.1007/s00401-011-0802-6.

Schwartz, R. A., Fernández, G., Kotulska, K., Józwiak, S. (2007). Tuberous sclerosis complex: advances in diagnosis, genetics, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(2), 189-202.

Sievert, A. J., Fisher, M. J. (2009). Pediatric Low-Grade Gliomas. *Journal of Child Neurology*, 24(11), 1397–1408. doi:10.1177/0883073809342005.

Sievert, A. J., Jackson, E. M., Gai, X., Hakonarson, H., Judkins, A. R., Resnick, A. C., et al. (2009). Duplication of 7q34 in Pediatric Low-Grade Astrocytomas Detected by High-Density Single-Nucleotide Polymorphism-Based Genotype Arrays Results in a Novel *BRAF* Fusion Gene. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 19(3), 449–458. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00225.x.

Skuse, G. R., Kosciulek, B. A., Rowley, P. T. (1991). The neurofibroma in von Recklinghausen neurofibromatosis has a unicellular origin. *American Journal of Human Genetics*, 49(3), 600–607.

Sofroniew, M. V., Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8.

Stokland, T., Liu, J.-F., Ironside, J. W., Ellison, D. W., Taylor, R., Robinson, K. J., et al. (2010). A multivariate analysis of factors determining tumor progression in childhood low-grade glioma: a population-based cohort study (CCLG CNS9702). *Neuro-Oncology*, 12(12), 1257–1268. doi:10.1093/neuonc/noq092.

Stupp, R., Reni, M., Gatta, G., Mazza, E., Vecht, C. (2007). Anaplastic astrocytoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63(1), 72-80. doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.03.003.

Tatevossian, R. G., Lawson, A. R., Forshew, T., Hindley, G. F., Ellison, D. W., Sheer, D. (2010). MAPK pathway activation and the origins of pediatric low-grade astrocytomas. *Journal of Cellular Physiology*, 222(3), 509-514. doi: 10.1002/jcp.21978.

Theeler, B. J., Ellezam, B., Sadighi, Z. S., Mehta, V., Tran, M. D., Adesina, A. M., Bruner, J. M., Puduvalli, V. K. (2014). Adult pilocytic astrocytomas: clinical features and molecular analysis. *Neuro-Oncology*, 16(6), 841-847. doi: 10.1093/neuonc/not246.

Thiel, A., Ristimäki, A. (2013). Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF. *Frontiers in Oncology*, 3, 281. doi:10.3389/fonc.2013.00281.

Tian, Y., Rich, B. E., Vena, N., Craig, J. M., MacConaill, L. E., Rajaram, V., et al. (2011). Detection of *KIAA1549-BRAF* Fusion Transcripts in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Pediatric Low-Grade Gliomas. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 13(6), 669–677. doi:10.1016/j.jmoldx.2011.07.002.

Tihan, T., Fisher, P. G., Kepner, J. L., Godfraind, C., McComb, R. D., Goldthwaite, P. T., Burger, P. C. (1999). Pediatric astrocytomas with monomorphous pilomyxoid features and a less favorable outcome. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(10), 1061-1068.

Vosecká, T., Musil, Z., Vícha, A. (2014). Průkaz chromozomálních změn u nádorových onemocnění pomocí CGH, array-CGH a SNP array. *Česko-slovenská patologie*, 50(1), 25-29.

Wen, P. Y., Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *The New England Journal of Medicine*, 359, 492-507. doi: 10.1056/NEJMra0708126.

Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., et al. (2009). *IDH1* and *IDH2* Mutations in Gliomas. *The New England Journal of Medicine*, 360(8), 765–773. doi:10.1056/NEJMoa0808710.

Yu, J., Deshmukh, H., Gutmann, R. J., Emnett, R. J., Rodriguez, F. J., Watson, M. A., et al. (2009). Alterations of *BRAF* and *HIPK2* loci predominate in sporadic pilocytic astrocytoma. *Neurology*, 73(19), 1526–1531. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c0664a.

Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zha, Z., Wang, P., et al. (2009). Glioma-Derived Mutations in *IDH1* Dominantly Inhibit *IDH1* Catalytic Activity and Induce HIF-1 $\alpha$ . *Science (New York, N.Y.)*, 324(5924), 261–265. doi:10.1126/science.1170944.