

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2011**

**Bc. Eva Mikulíková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Cytogenetické markery u glioblastomu a jejich  
význam pro diagnosticko-léčebnou rozvahu**

**Diplomová práce**

**Bc. Eva Mikulíková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2011**

**Vedoucí práce: RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně s pomocí mého vedoucího práce, RNDr. Radka Trojance, Ph.D., za použití literatury, uvedené na konci práce.

V Olomouci dne 12. 5. 2011

.....

Bc. Eva Mikulíková

Chtěla bych poděkovat RNDr. Radku Trojancovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a veškerou pomoc při zpracovávání práce, Mgr. Vladimíře Koudelákové a MUDr. Ondřejovi Kalitovi, Ph.D za cenné rady a připomínky. Také bych ráda poděkovala Soně Mlčochové za odbornou pomoc při práci v Laboratoři experimentální medicíny.

## SOUHRN

Glioblastoma multiforme (GBM) patří mezi nejzávažnější nádorová onemocnění a představuje přibližně 17% ze všech mozkových nádorů. I přes veškerý vědecký pokrok v oblasti neuroonkologie zůstává jeho diagnostika velmi složitá a léčba nedostatečně účinná. Při optimální terapii je medián přežití pacientů s glioblastomem asi 12 měsíců. GBM vzniká jako primární onemocnění (*de novo*), či vzniká sekundárně, vývojem z nižších stupňů. Při vývoji glioblastomu vznikají a kumulují se chromozomální a genové aberace. Tyto abnormality by mohly být použity jako tzv. markery, pro zpřesnění gradu onemocnění a zároveň tvoří potenciální cíl pro specifickou (cílenou) terapii. Jednou z možností jejich stanovení je cytogenetické vyšetření metodou fluorescenční *in situ* hybridizace. V praktické části diplomové práce byly připraveny lokusově specifické sondy pro geny C-myc, N-myc, CCND1 a BCR a centromerické sondy pro chromozomy 8 a 11. Tyto sondy byly zařazeny do sady sond, které jsou běžně používány v Laboratoři experimentální medicíny pro vyšetření tkáňových řezů pacientů s GBM. V rámci projektu byl u pacientů s GBM vyšetřen status chromozomálních oblastí 1p36.3, 9p21.3, 19q13, genů TP53, EGFR, RB1, MDM2, C-myc, N-myc, CCND1, BCR a chromozomů 7, 8, 10, 11 a 13. Do projektu byli zařazeni pacienti s diagnózou GBM, kteří prodělali první operaci v letech 2005-2010. V tomto souboru pacientů se nejčastěji vyskytovala amplifikace genu EGFR (62%), zmnožení počtu kopií genu BCR (52%), delece BCR (26%), amplifikace genu C-myc (47%) a delece v oblasti 9p (31%). Cílem diplomové práce bylo potvrdit význam nalezených aberací pro zpřesnění diagnostiky, prognózu onemocnění či predikci léčby. Předběžné výsledky naznačují, že některé ze stanovovaných parametrů by mohly mít význam především na délku přežití pacientů (například se zdá, že amplifikace genu MDM2 zkracuje dobu přežití pacientů), avšak získaná data nejsou dosud statisticky dostatečně významná. Z tohoto důvodu bude v navazujícím projektu stávající soubor prospektivně doplněn o další pacienty, data z výsledků microarray analýz a získané údaje budou korelovány s dalšími klinickými parametry.

## SUMMARY

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most serious cancer type and represent approx. 17% of all brain tumors. Despite all improvements in neurooncology, diagnosis remains difficult and treatment is ineffective enough. Median survival time of GBM treated patients is 12 months. GBM develops either as a primary disease (*de novo*) or it develops secondary from the low grade gliomas. Genetic and chromosomal aberrations occur and accumulate during GBM development. These abnormalities could be used as so-called markers to refine grade of disease and as potential target of specific (targeted) therapy. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is one of the cytogenetic method for determination of these markers. In this diploma thesis, locus-specific DNA probes for the genes C-myc, N-myc, CCND1, and BCR and centromeric probes for chromosomes 8 and 11 were constructed. These probes were implied into the diagnostic set for routine usage in Laboratory of Experimental Medicine for examination of patient tissue sections of glioblastoma multiforme. Consequently, cytogenetic aberrations were examined in chromosomal regions 1p36.3, 9p21.3, 19q13, genes TP53, EGFR, RB1, MDM2, C-myc, N-myc, CCND1, BCR and chromosomes 7, 8, 10, 11 and 13 in a group of patients with GBM, who underwent first surgery in the years 2005-2010. In this group of patients, the most frequent aberrations were amplification of EGFR gene (62%), increased copy number of BCR gene (52%), BCR deletions (26%), amplification of C-myc gene (47%) and deletion of 9p (31%). The aim of this project was to confirm importance of cytogenetic aberrations for the diagnosis, prognosis and therapy prediction. Preliminary results suggested that some of the determined parameters might be importance for patients survival (for example, it appears that MDM2 amplification diminishes survival time of patients) but the obtained data are not statistically significant yet. For this reason, in the following project, group of patients will be extended for further patients; obtained data will be supplemented by microarray analysis data and subsequently correlated with other clinical and laboratory parameters.

# OBSAH

OBSAH.....	7
1 ÚVOD.....	9
1.1 Nádory centrální nervové soustavy.....	9
1.1.1 Dělení nádorů CNS.....	10
1.1.1.1 Nádory z vývojové řady glie .....	10
1.1.1.1.1 Astrocytom grade I,II .....	11
1.1.1.1.2 Anaplastický astrocytom grade III .....	12
1.1.1.1.3 Glioblastom grade IV .....	12
1.1.1.2 Nádory z vývojové řady neuronů .....	12
1.1.1.3 Nádory mozkových plen .....	12
1.1.1.4 Jiné nádory CNS .....	13
1.1.2 Obecné příznaky.....	15
1.1.3 Diagnostika.....	16
1.1.4 Terapie.....	17
1.1.4.1 Chirurgická léčba .....	17
1.1.4.2 Radioterapie .....	18
1.1.4.3 Chemoterapie .....	18
1.1.4.4 Specifická léčba .....	19
1.1.5 Prognostické faktory.....	19
1.2 Glioblastom grade IV (glioblastoma multiforme, GBM).....	19
1.2.1 Charakteristika.....	19
1.2.2 Terapie.....	21
1.2.2.1 Klasické přístupy .....	21
1.2.2.2 Moderní experimentální přístupy .....	22
1.3 Genetické a cytogenetické změny nacházené u GBM.....	25
1.3.1 Chromozomální oblast 9p (LOH 9p)/oblast genu CDKN2A .....	26
1.3.2 Chromozomální oblast 13q (LOH 13q)/oblast genu RB1 .....	27
1.3.3 Chromozom 10 .....	27
1.3.4 Chromozomální oblast 17p (LOH 17p) / oblast genu TP53.....	28
1.3.5 Gen MDM2 .....	30
1.3.6 Gen EGFR .....	31
1.3.7 Geny PDGF/R .....	33

1.3.8	Gen IDH1 .....	34
1.3.9	Gen C-myc.....	35
1.3.10	Gen N-myc .....	37
1.3.11	Cyklin D1 .....	38
1.3.12	Gen BCR .....	40
2	CÍLE PRÁCE .....	42
3	MATERIÁL A METODIKA .....	43
3.1	Použitý materiál .....	45
3.1.1	Chemikálie, přístrojové vybavení, software .....	45
3.1.2	Použité roztoky .....	46
3.2	Nádorové vzorky a charakteristiky pacientů .....	47
3.3	Použité metody .....	47
3.3.1	Příprava sondy .....	47
3.3.1.1	Kultivace a izolace plazmidové DNA .....	47
3.3.1.2	Značení random prime .....	47
3.3.2	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace .....	48
3.3.3	Metoda reFISH .....	49
4	VÝSLEDKY .....	50
5	DISKUZE .....	56
6	ZÁVĚR.....	61
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	62
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	88

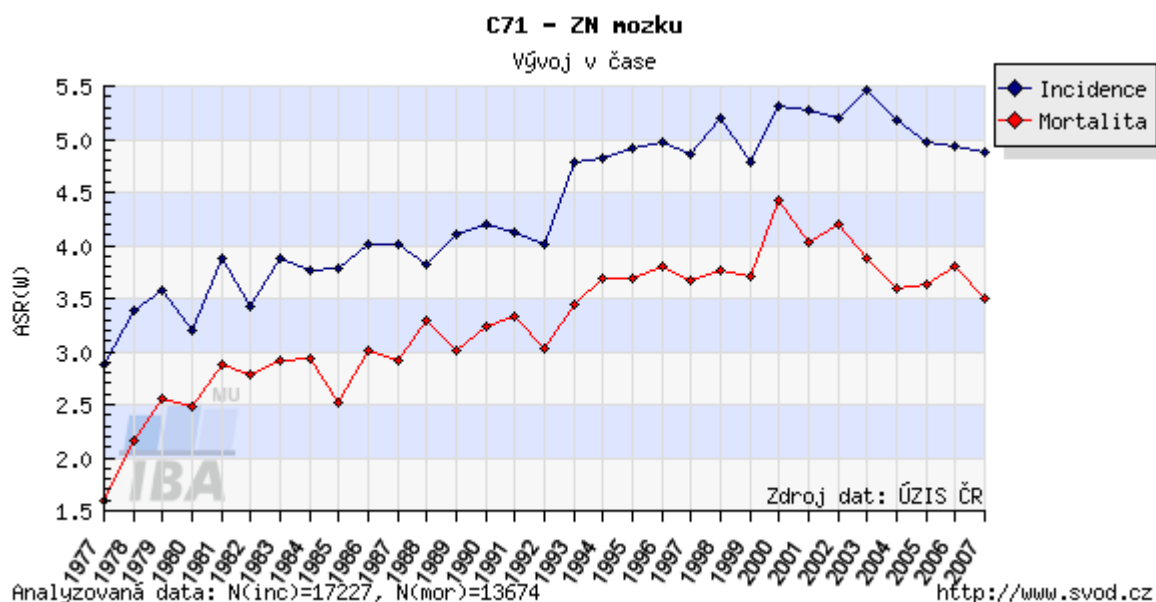


# 1 ÚVOD

## 1.1 Nádory centrální nervové soustavy

Nádory centrální nervové soustavy představují 1-2% všech nádorových onemocnění (www.linkos.cz, 2011). Mozek je centrální orgán, který řídí přímo nebo nepřímo všechny tělesné funkce. Proto je ochraňován kostěným obalem (lebkou), vazivovými obaly (mozkovými plenami) a také hematoencefalickou bariérou, která k němu propouští jen určité látky. Zhoubné i nezhoubné nádory mohou tkáň mozku utlačovat a tím působit tlak na okolní zdravou tkáň a proto musí být léčeny. Chirurgická léčba bývá právě díky lokalizaci v CNS komplikovaná. Navíc hematoencefalická bariéra nepropouští většinu cytostatik a léčiv, což podstatně snižuje terapeutické možnosti (Keller *et* Jedlička, 2005; Klener, 2002).

Incidence tumorů CNS je 4,87 případů/100 000 osob/rok, 5,6 případů/100 000/rok u mužů a 4,24 případů/100 000/rok u žen. Z Obr. 1 je patrná vzrůstající incidence a mortalita v uplynulých třiceti letech. Incidence má 2 vrcholy, jeden u dětí do 5 let věku, druhý ve věku nad 65 let (www.svod.cz, 2011).



**Obr. 1:** Incidence a mortalita nádorů CNS v čase.

(www.svod.cz, 2011)

Převážnou většinu nádorů CNS tvoří nádory se sporadickým (dědičně nepodmíněným) výskytem. Známý jsou i familiární formy zvýšeného výskytu nádorů mozku, jako součást některých vrozených syndromů, například neurofibromatóza 1 a 2, syndrom Li-Fraumeni nebo Turkotův. Roli ve vzniku nádorů CNS mohou hrát i specifické genetické polymorfismy, zejména polymorfismy v genech, podílejících se na procesu opravy DNA, metabolismu tumoru a imunitních funkcích (Bondy *et al.*, 2008; Collins, 2004).

Nádory mohou vznikat jako primární (přímo z postižených orgánů), či jako sekundární (metastázy z jiných orgánů) (Keller *et* Jedlička, 2005).

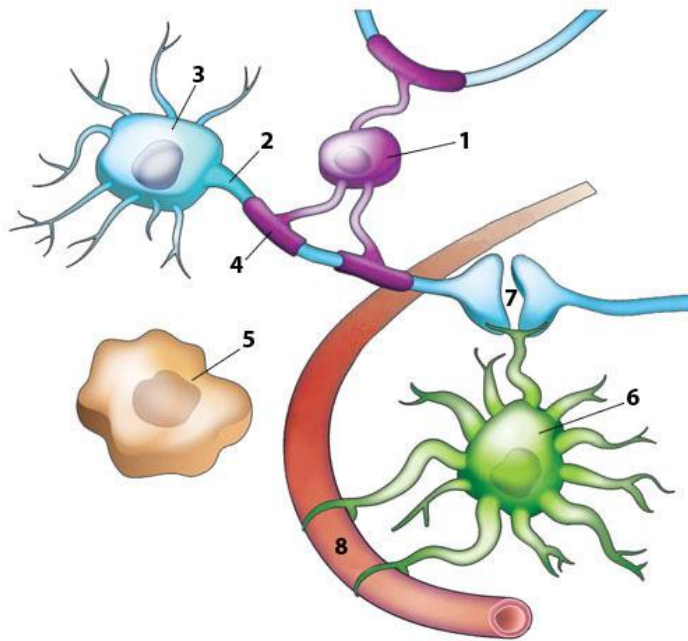
### **1.1.1 Dělení nádorů CNS**

Nádory CNS mohou být děleny podle různých kritérií. Podle jejich chování lze rozdělit nádory CNS na benigní a maligní. Toto rozdělení je však (s výjimkou dětských nádorů CNS) velmi iluzorní, neboť zejména gliomy velmi často progredují a i benigní případy se postupem času vyvinou na maligní. Dalším způsobem rozdělení může být dělení podle místa vzniku na nádory intracerebrální a extracerebrální (Malec *et* Šuba, 2006). V současné době je používáno dělení nádorů podle World Health Organization (WHO) z roku 2007. Podle tohoto jsou neuroepiteliální nádory rozděleny podle histogenetického původu a podle stupně vývoje nádoru (grade onemocnění). Dle histogenetického původu dělíme nádory CNS na: (Dvořák, 2010)

- Nádory z vývojové řady glie (astrocytom, oligodendrogliom, ependymom)
- Nádory z vývojové řady neuronů (meduloblastom, neuroblastom, gangliogliom, neurocytom)
- Nádory mozkových plen (meningeom)
- Jiné nádory CNS (např. adenom hypofýzy, kraniofaryngeom)

#### **1.1.1.1 Nádory z vývojové řady glie**

Gliomy jsou nejčastější nádory mozkové tkáně. Jedná se o tumory derivující z glie (podpůrné buňky) (Obr. 2). Nejčastěji jsou odvozeny z astrocytů (astrocytomy), dále mohou být odvozeny z oligodendroglíí (oligodendrogliomy) a buněk ependymu (ependymomy) (Venter *et* Thomas, 1991).



**Obr. 2:** Typy gliálních buněk

1-oligodendroglie, 2-axon neuronu, 3-tělo neuronu, 4-myelinová pochva, 5-mikroglie, 6-astrocyt, 7-synaptická štěrbina, 8-krevní céva.

(<http://med.stanford.edu>, 2011)

Gliomy představují široké spektrum nádorů, které se liší lokalizací v CNS, věkovou či genetickou predispozicí, základním morfoloickým vzhledem, růstovým potenciálem, rozsahem invazivního růstu, sklonem k progresi a klinickým průběhem. Tato rozdílnost je dána typem a sekvencí genetických změn, které tumor získal během procesu nádorové transformace (Němeček *et al.*, 2006).

#### **1.1.1.1.1 Astrocytom grade I, II**

Řadí se k tzv. gliomům s nízkým vývojovým stupněm (low grade gliomům). Manifestují se nejčastěji ve středním věku. Je-li možná totální resekce, je prognóza příznivá. Růst je pomalý, zpravidla dobře ohraničený, výjimečně infiltrativní do bílé hmoty mozkové. Po vyjmutí často recidivuje. Anamnéza je dlouhá (roky), typickým příznakem jsou epileptické záchvaty. Během této doby často dochází k transformaci ve vyšší stupeň malignity (Dvořák, 2010; Klener, 2002; Kozler *et al.*, 2007; Mumenthaler *et Mattle*, 2001).

#### **1.1.1.1.2 Anaplastický astrocytom grade III**

Anamnéza je kratší než v případě astrocytomu grade I (měsíce). Prognóza je nejistá. Vykazuje mikroskopickou polymorfii a výraznou mitotickou aktivitu. Může metastazovat likvorem a může se z něj vyvinout glioblastom (Dvořák, 2010; Klener, 2002).

#### **1.1.1.1.3 Glioblastom grade IV**

Maligní varianta gliomu, který vzniká převážně u dospělých. Roste velmi rychle, infiltrativně a je vysoce zhoubný. Projevuje se nejčastěji ve středním věku subakutně vzniklou psychickou změnou, ložiskovou symptomatikou nebo epileptickými záchvaty. Prognóza je velmi nepříznivá (týdny), většina nemocných umírá do 12 měsíců od prvních klinických příznaků. Terapie je chirurgická, radioterapie a chemoterapie (Dvořák, 2010; Klener, 2002; Riemenschneider *et* Reifenberger, 2009).

#### **1.1.1.2 Nádory z vývojové řady neuronů**

Mezi nejčastější typ nádorů z této vývojové řady patří neuroblastom. Jedná se o onemocnění typické především pro dětský věk, tvořící 8-10% všech dětských nádorových onemocnění a v průběhu prvního roku života je nejčastějším solidním nádorem. Vzniká z tkání sympatického nervového systému a nejčastěji se vyskytuje v nadledvinách. Většina neuroblastomů je diagnostikována do 4 let života. Nádor je biologicky velmi variabilní, může obsahovat buňky na různém stupni vyžívání, některé tumory mohou velmi prudce proliferovat, jiné mohou i spontánně diferencovat a být samovolně organismem eliminovány (Kozler *et al.*, 2007; Mazánek *et al.*, 2008).

#### **1.1.1.3 Nádory mozkových plen**

Mozek a míchu obalují vazivové obaly, tzv. mozkové pleny. Ty jsou tvořeny třemi vrstvami vazivové tkáně: tvrdá plena (dura mater), která tvoří zevní pevný obal a dvě měkké pleny, omozečnice (pia mater), která obaluje mozek a pavučnice (arachnoidea), která se nachází mezi nimi. Meningeomy jsou relativně časté (asi 15% mozkových nádorů), manifestují se převážně v dospělosti. Jsou dobře diferencované s omezenou

proliferační aktivitou a invazivitou, proto jsou považovány za benigní. Přesto ohrožují nemocného na životě útlakem okolní zdravé tkáně a vznikem nitrolební hypertenze. Zřídka se vyskytují i maligní formy (Dylevský, 2009; Klener, 2002; Vaněčková *et* Seidl, 2004).

#### 1.1.1.4 Jiné nádory CNS

Mezi tyto onemocnění řadíme například:

- Adenom hypofýzy – nádory hypofýzy představují asi desetinu nitrolebních nádorů a jsou většinou benigní. Mohou být hormonálně afunkční (inaktivní) nebo funkční (aktivní). Inaktivní neprodukují hormony, ale svým růstem utlačují hypofýzu a vzniká tzv. hypopituitarismus. Adenom může způsobovat zrakové poruchy útlakem zrakového nervu a chiasmatu. Pokud secernuje prolaktin, je označován jako prolaktinom. Ten u žen způsobuje poruchy menstruačního cyklu a sterilitu. U mužů působí snížení libida, potence i spermiogeneze. Dále může secernovat adrenokortikotropní hormon (ACTH). Tím působí tzv. Cushingovu chorobu. Typickými příznaky jsou tzv. cushingoidní obezita, charakterizovaná maximálním ukládáním tuku v oblasti břicha a obličeje, s výraznými striemi na kůži, tenké končetiny, svalová ochablost, steroidní diabetes, zvýšení krevního tlaku, poruchy menstruačního cyklu u žen. Adenom může také produkovat růstový hormon (STH). Jeho příznaky závisí na věku nemocného jedince, může to být gigantismus nebo akromegalie (zvětšení některých částí těla – například prsty, nos, jazyk). Dalšími příznaky jsou bolesti hlavy, u žen amenorea (Kala, 2007; Klener, 2002; Mumenthaler *et* Mattle, 2001).
- Kraniofaryngiom – vyskytuje se nejčastěji u dětí a mladých osob. Vyrůstá z epitelu ducta craniopharingea. Roste pomalu, ohraničeně, utlačuje mozkovou tkáň, může vyvolat poruchy zorného pole, bitemporální hemianopsii až oslepnutí útlakem chiasmatu. Léčba je chirurgická, ovšem nádor je obtížně přístupný a obvykle se nepodaří totální odstranění (Hartl *et al.*, 1985; Klener, 2002).

<b>1. Nádory neuroepiteliální tkáně</b>	Paragangliom
<b>Astrocytární nádory</b>	<b>Nádory pineální oblasti</b>
Pilocytický astrocytom	Pineocytom
Pilomyxoidní astrocytom	Nádor z pineálního parenchymu se střední diferenciací
Subependymální obrovsko-buněčný astrocytom	Pineoblastom
Pleomorfní xanthoastrocytom	Papilární nádor pineální oblasti
Difuzní astrocytom	<b>Embryonální nádory</b>
Fibrilární astrocytom	Meduloblastom
Gemistocytární astrocytom	Desmoplastický/modulární meduloblastom
Protoplazmický astrocytom	Meduloblastom s extensit nodularity
Anaplastický astrocytom	Anaplastický meduloblastom
Glioblastom	Velkobuněčný meduloblastom
Obrovsko buněčný glioblastom	CNS primitivní neuroektodermální nádor
Gliosarkom	CNS neuroblastom
Gliomatosis cerebri	CNS ganglioneuroblastom
<b>Oligodendroglíální nádory</b>	Meduloepiteliom
Oligodendrogliom	Ependymoblastom
Anaplastický oligodendrogliom	Atypický teratoidní/rhabdoidní nádor
Oligoastrocytární nádory	<b>2. Nádory kraniálních a paraspinálních nervů</b>
Oligoastrocytom	Schwannom (neurilemmom, neurinom)
Anaplastický oligoastrocytom	Celulární
<b>Ependymální nádory</b>	Plexiformní
Subependymom	Melanotický
Myxopapilární ependymom	Neurofibrom
Ependymom	Plexiformní
Celulární	Perineuriom
Papilární	Perineuriom, NOS
„clear cell“	Maligní perineuriom
Tanycytický	MPNST s mezenchymální diferenciací
<b>Nádory choroidálního plexu</b>	Melanotický MPNST
Papilom	MPNST s glandulární diferenciací
Atypický papilom	<b>3. Nádory meningiální tkáně</b>
Karcinom	<b>Meningoteliální nádory</b>
<b>Jiné neuroepiteliální nádory</b>	Meningeom
Astroblastom	Meningoteliální
Chordoidní gliom třetí komory	Fibrilární (fibroblastický)
Angiocentrický gliom	Smíšený
<b>Neuronální a smíšené neuronálně-gliální nádory</b>	Psamomatózní
Dysplastický gangliocytom mozečku	Angiomatózní
Desmoplastický infantilní gangliogliom	Mikrocystický
Dysembryoplastický neuroepiteliální nádor	Sekretorický
Gangliocytom	Lymfoplazmatický
Gangliogliom	Metaplastický
Anaplastický gangliogliom	„clear cell“
Centrální neurocytom	Atypický
Extraventriculární neurocytom	Papilární
Cerebelární liponeurocytom	Rhabdoidní
Papilární glioneuronální nádor	Anaplastický (maligní)
Glioneuronální nádor IV. komory	<b>Mezenchymální nádory</b>

Lipom	Maligní melanom
Angiolipom	Meningiální melanomatóza
Hibernom	<b>Jiné nádory spojené s meningeami</b>
Liposarkom	Hemangioblastom
Solitární fibrózní nádor	<b>4. Lymfomy a hemopoetické nádory</b>
Fibrosarkom	Maligní lymfom
Maligní fibrózní	Plazmocytom
Leiomyom	Granulární sarkom
Leiomyosarkom	<b>5. Nádory germinativních buněk</b>
Rhabdomyom	Germiom
Rhabdomyosarkm	Embryonální karcinom
Chondrom	Nádor žlutkového váčku
Chondrosarkom	Choriokarcinom
Osteom	Teratom
Osteosarkom	Zralý
Osteochondrom	Nezralý
Hemangiom	Teratom s maligní transformací
Epiteliální hemangioendoteliom	Směšený nádor
Hemangiopericytom	<b>6. Nádory selární oblasti</b>
Anaplastický hemangiopericitom	Kraniofaryngeom
Angisarkom	Adamantinomatózní
Kaposiho sarkom	Papilární
Ewingův sarkom-PNET	Nádor granulárních buněk
<b>Primární melanocytické nádory</b>	Pituicytom
Difúzní melanóza	Vřetenobuněčný onkocytom adenohipofýzy
Melanocytom	<b>7. Metastatické nádory</b>

**Tab. 3:** Klasifikace nádorů centrální nervové soustavy podle WHO 2007.

(Luis *et al.*, 2007)

### 1.1.2 Obecné příznaky

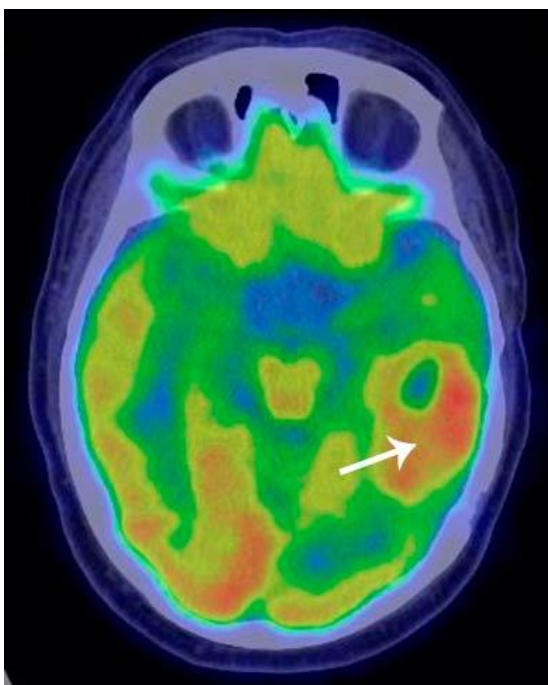
Mozkové nádory se manifestují širokým spektrem příznaků, od bolestí hlavy až po psychické změny osobnosti nemocného. Neurologický nález je dán lokalizací nádoru, biologickou povahou (rychlost růstu nádoru) a směrem šíření, popřípadě druhotnými změnami v nádorové tkáni (edém, krvácení do nádoru, hydrocefalus aj). Příznaky můžeme rozdělit na celkové a ložiskové. Celkové příznaky jsou způsobeny syndromem nitrolební hypertenze a patří sem například bolesti hlavy, zvracení, závratě, bradykardie nebo oligurie. Podkladem vzniku nitrolební hypertenze je růst nádoru v uzavřené oblasti a vznik mozkového edému. Ložiskové příznaky (zánikové a iritační) vznikají utlačením nebo poškozením tkáně rostoucím nádorem, v jejichž důsledku dojde k výpadku funkce této části mozku, například poruchy hybnosti, zraku, řeči aj. až po poruchy chování – tzv. prefrontální syndrom a změny osobnosti nemocného (častá je agresivita nebo naopak

apatie, poruchy paměti). Mezi tyto patří také například epileptické záchvaty. Jsou častým příznakem a mohou být v rozsahu od mírných záškubů až po silné záškuby všech končetin doprovázené poruchami vědomí (Ehler, 2006; Němeček *et al.*, 2010; [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz), 2011).

### 1.1.3 Diagnostika

Pro správnou léčbu nádoru CNS je důležité nádorovou tkáň, co nejlépe charakterizovat a klasifikovat (Collins, 2004).

Podezření na mozkový nádor může přinést pečlivá anamnéza a neurologické vyšetření. V diferenciální diagnostice je důležité odlišit nádory od chronického subdurálního hematomu, abscesu, někdy i encefalitidy. Nezastupitelnou úlohu při diagnostice, stanovení rozsahu resekce a pooperačním sledování mají zobrazovací techniky. V první řadě jsou to magnetická rezonance (MR) a počítačová tomografie (CT). Při výzkumných účelech lze použít pozitronovou emisní tomografii (PET) (Obr. 4) nebo jednofotonovou emisní počítačovou tomografii (SPECT) (Frappaz *et al.*, 2003; Hartl *et al.*, 1985).



**Obr. 4:** Zobrazení glioblastomu multiforme pomocí pozitronové emisní tomografie. ([www.mayoclinic.org](http://www.mayoclinic.org), 2011)



Dalšími pomocnými vyšetřovacími metodami může být vyšetření očního pozadí, vyšetření EEG (elektroencefalogram) a vyšetření likvoru (Klener, 2002).

Pro definitivní diagnózu je důležitý odběr (biopsie) podezřelé tkáně a její histologické vyšetření. Histologická diagnostika se neprovádí pouze v případech, pokud by odběrem tkáně mohlo dojít k neúměrným komplikacím. Při imunohistochemickém vyšetření mohou být použity např. cytoskeletální markery nebo antigeny specifické pro aktivní fázi buněčného cyklu. Imunocytochemické metody jsou ale pro klasifikaci nedostatečné, protože vyžadují antigen typicky exprimovaný nádorovou buňkou. Antigeny, které by jednoznačně identifikovaly různé podtypy nádorů, však neexistují (Collins, 2004; Němeček *et al.*, 2010; [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz), 2011).

V uplynulých letech identifikovaly výzkumy mnoho cytogenetických a molekulárně-genetických aberací, které mohou pomoci při klasifikaci gliomů, zvláště v případech, kdy není možné přesvědčivé histologické zařazení. Některé markery slouží i při klinickém hodnocení, jsou to zejména hypermetylace MGMT promotoru u GBM a delece chromozomálních oblastí 1p a 19q u pacientů s oligodendrogliálními tumory. Kromě geneticky významných změn je prognosticky významná i míra exprese jednotlivých genů. Vhodnou metodou pro odhalení změn genové exprese je cDNA microarray (Ohgaki *et Kleihues*, 2005; Riemenschneider *et Reifenberger*, 2009).

## **1.1.4 Terapie**

### **1.1.4.1 Chirurgická léčba**

Chirurgické odstranění nádoru je nejpoužívanějším způsobem léčby. U velké skupiny pacientů s nádory mozku ovšem chirurgickou resekci nelze provést (vzhledem k jejich anatomické lokalizaci či rozsahu). Často je možná pouze biopsie nádoru za účelem laboratorní diagnostiky nádoru. Při chirurgické léčbě dochází k odebrání nádorové masy, což vede k ovlivnění kinetiky zbylých nádorových buněk, které tak přechází z klidové fáze G<sub>0</sub> do buněčného cyklu a stávají se citlivějšími k následné terapii. Chirurgický zákrok i u dobře přístupných nádorů bývá doprovázen celou řadou pooperačních komplikací, pacienti mohou například ztrácet schopnost číst, psát, mluvit a mohou být ovlivněny i další mozkové funkce. Rekonvalescence bývá velmi náročná a pacienti často nebývají plně schopni se vrátit do předchozího způsobu života. Chirurgická léčba bývá

doplňována následnou adjuvantní terapií. Kritérii pro chirurgické řešení jsou především věk pacienta a jeho celkový zdravotní stav (Frappaz *et al.*, 2003; Kala, 1998; Klener, 2002).

#### **1.1.4.2 Radioterapie**

U inoperabilních nádorů se používá jako metoda první volby. Po chirurgickém odstranění nádoru je využívána jako adjuvantní léčba. Nejčastěji se používá kobaltový ozařovač nebo vysokoenergetický urychlovač záření. Maligní gliomy jsou poměrně citlivé na radiační terapii, což může být způsobeno malým množstvím glutathioninu, který obsahují cévy v mozkových nádorech. Nízká hladina glutathioninu vede k poškození cév zářením s následnou trombózou a ischemickou nekrózou nádorové tkáně (Kala, 1998; Klener, 2002).

#### **1.1.4.3 Chemoterapie**

Do mozku procházejí pouze lipofilní látky (např. deriváty nitrosomočoviny, prokarbazin, temozolomid) a malé neiontové molekuly s molekulovou hmotností do 200 (např. 5-fluorouracil), proto je chemoterapie omezená. Další překážkou je změna tlakového gradientu mezi kapilárami a extravaskulárním prostorem, což je způsobeno nitrolební hypertenzí. Vliv má jistě i biologická povaha nádoru (malá růstová frakce). Ovšem i přes tato omezení má chemoterapie u pacientů s nádory CNS prokazatelný vliv na léčebnou odpověď a na dobu přežití. Nejrozšířenější formou je monoterapie (deriváty nitrosomočoviny - karmustin, lomustin; prokarbazin; cisplatina). U agresivnějších forem je účinnější kombinovaná chemoterapie. K paliativní léčbě inoperabilních nádorů lze použít radioterapii nebo chemoterapii, v optimálním případě jejich kombinaci. Kromě celkové chemoterapie lze u pacientů s rekurentními nádory rovněž použít lokální chemoterapii bis-chloronitrosureou (Karmustin, BCNU) (Frappaz *et al.*, 2003; Kala, 1998; Klener, 2002; Zhang *et al.*, 2006).

#### **1.1.4.4 Specifická léčba**

V současné době se na různých úrovních preklinického nebo klinického zkoušení testuje použití nových postupů a aplikace cílených léčiv. Patří sem například inhibitory angiogeneze, inhibitory receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), inhibitory růstových faktorů nebo polyaminů, dále také fotodynamická terapie, imunoterapie nebo genová terapie. I přes rozsáhlý výzkum však zůstávají možnosti použití těchto látek velmi omezené (Klener, 2002; Schor, 2009).

#### **1.1.5 Prognostické faktory**

Výzkum je v současné době zaměřen na identifikaci a pochopení tumorových markerů nebo charakteristik pacientů, které mají vliv na přežití a odpověď na léčbu. Ke klasickým prognostickým faktorům patří histologický typ a grade onemocnění, věk pacienta, rozsah resekce, lokalizace tumoru, citlivost na radioterapii a chemoterapii (Bondy *et al.*, 2008).

Nové výzkumy se zaměřují na genetické změny či změny v expresním profilu nádoru, jako na možné prediktivně-prognostické markery. Např. kombinovaná ztráta chromozomů 1p a 19q je příznivý prognostický faktor u pacientů s oligodendrogliomy (Felsberg *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2000). Naopak amplifikace EGFR bývá ve studiích popisována ve spojení s kratším přežitím u pacientů s glioblastoma multiforme (GBM) (Shinojima *et al.*, 2003; Simmons *et al.*, 2001). Methylace promotoru MGMT genu u pacientů s GBM je dobrým prediktivním markerem pro léčbu temozolomidem (Bondy *et al.*, 2008; Hegi *et al.*, 2005; Stupp *et al.*, 2005).

### ***1.2 Glioblastom grade IV (glioblastoma multiforme, GBM)***

#### **1.2.1 Charakteristika**

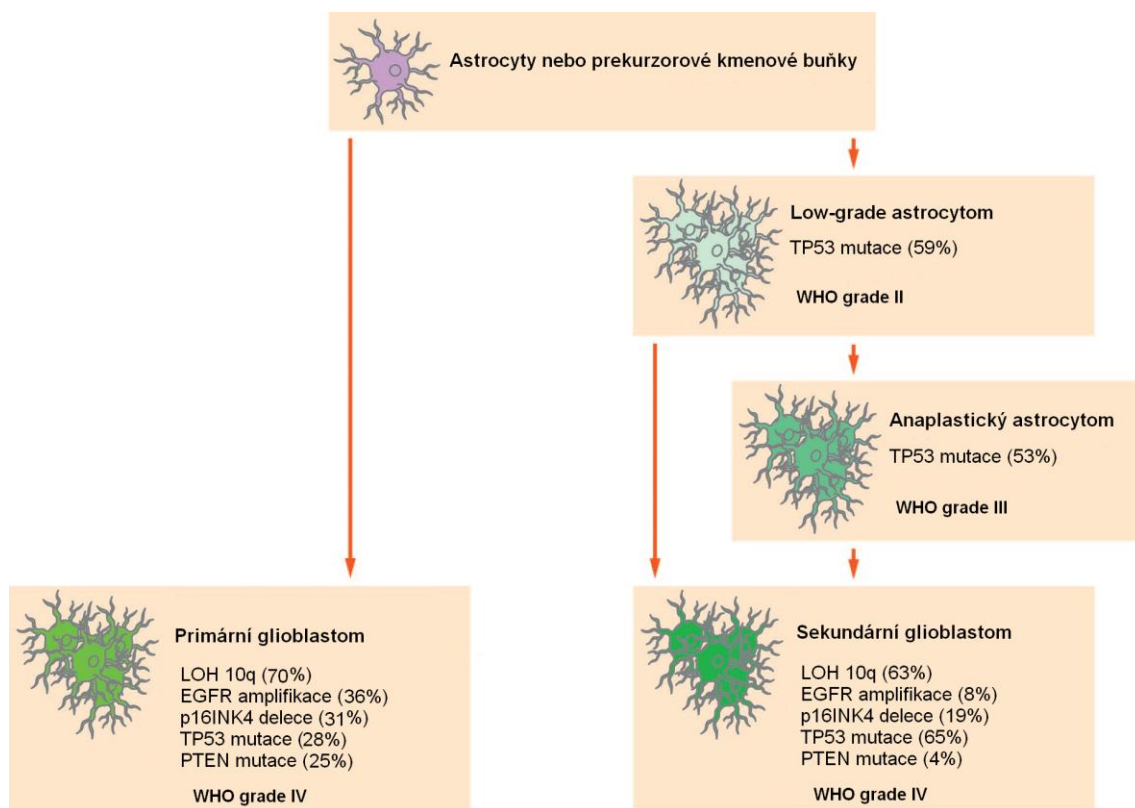
Glioblastomy grade IV jsou nejagresivnějším typem gliomů a představují 17% ze všech mozkových nádorů a 54% ze všech gliomů. Výskyt u mužů je častější, v porovnání s ženami v poměru 1,36:1 (CBTRUS 2010; Kala, 1998).

GBM roste velmi rychle, infiltrativně a je vysoce zhoubný. Začíná se projevovat nejčastěji ve středním věku, subakutně vzniklou psychickou změnou, ložiskovou symptomatikou nebo epileptickými záchvaty, objevují se poruchy rovnováhy, amnestická nebo sensorická fatická porucha a minimální hemiparéza. GBM může být mnohočetný, metastazovat likvorovými cestami do jiných částí CNS, výjimečně i do jiných částí těla (Dvořák, 2010; Kozler *et al.*, 2007; Mumenthaler *et Mattle*, 2001).

Dle způsobu vzniku lze glioblastomy rozdělit na primární a sekundární (Obr. 5).

Primární glioblastom - také označovaný jako *de novo* glioblastom – se manifestuje rychle, bez klinicky, radiologicky nebo morfologicky dokumentované maligní prekurzorové léze. Vzniká nejčastěji u starších pacientů (55-60 let). Jedná se o většinu případů GBM (80%) (Kleihues *et Cavenee*, 2000; Kraus *et al.*, 2001; Ohgaki *et Kleihues*, 2005).

Sekundární glioblastom - vzniká pomalou progresí z pre-existujícího gliomu nižšího gradu. Doba progresu z low grade astrocytomu do GBM je značně variabilní (od několika měsíců až po 10 let). Typicky vzniká u mladších pacientů (méně než 45 let), s mírnější převahou u mužů (Kleihues *et Cavenee*, 2000; Kraus *et al.*, 2001; Ohgaki *et Kleihues*, 2005).



**Obr. 5:** Genetické změny zahrnuté v evoluci GBM.

(Upraveno podle Ohgaki *et Kleihues*, 2007)

Bohužel, i přes současné pokroky v neuroonkologii, patří nadále tato skupina onemocnění k nejobtížněji léčitelným typům nádorů CNS, ať už jde o pacienty s primárním nebo sekundárním glioblastomem. Obě skupiny jsou od sebe histologicky obtížně rozeznatelné, vykazují ovšem jiné genetické alterace a vyskytují se u jiných věkových skupin pacientů. Přestože jsou považované za dvě rozdílná onemocnění, prognóza je u obou velmi nepříznivá, většina nemocných umírá do několika týdnů až měsíců od diagnózy. U pacientů dochází k rychlé progresi nemoci navzdory multimodální agresivní léčbě. Medián přežití je méně než 1 rok po diagnóze. Nicméně, v obou skupinách pacientů se vyskytují izolované případy, s dobou přežití výrazně vyšší než jeden rok. Pochopení podstaty těchto případů může napomoci ke zlepšení prognózy, ale především nasměrovat výzkum na vývoj vhodné biologické léčby (Burger *et Green*, 1985; Dvořák, 2010; Godard *et al.*, 2003; Ohgaki *et Kleihues*, 2005; Riemenschneider *et Reifenberger*, 2009).

Histologická charakteristika glioblastomu zahrnuje extrémní buněčnou dediferenciaci, mikroskopicky nápadnou buněčnost, buňky jsou převážně vřetenaté a charakteristicky palisádovitě řazené v okolí nekróz. Buňky jsou velké s velkými, nepravidelně laločnatými jádry. Typická je vysoká mitotická aktivita, buněčná pleomorfie, jaderná atypie, cévní trombózy, mikrovaskulární proliferace a nekróza tkáně (Dvořák, 2010; Němeček *et al.*, 2006).

Nádor bývá přednostně umístěn v mozkových hemisférách. Uvádí se, že přibližně 43% glioblastomů je lokalizováno ve frontálním laloku, 28% v temporálním, 25% v parietálním a 3% v okcipitálním laloku (Němeček *et al.*, 2006; Simpson *et al.*, 1993).

## **1.2.2 Terapie**

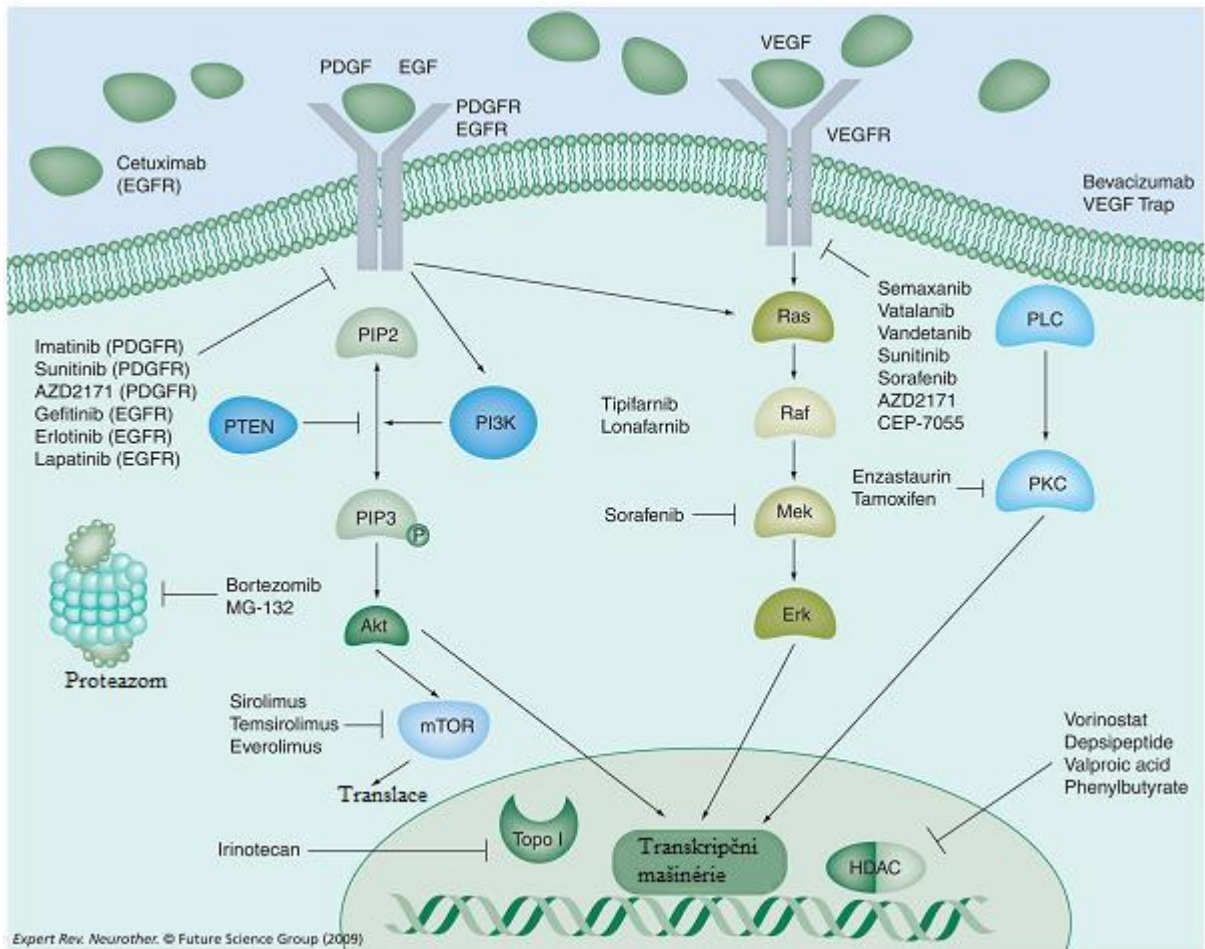
### **1.2.2.1 Klasické přístupy**

Věk, předoperační funkční status a rozsah tumoru jsou prognostické faktory pro celkové přežití a přežití bez známek progresu. Pacienti ve vysokém věku, s ko-morbiditami, se špatným funkčním statusem, s lézemi ve funkčních oblastech mozku umístěnými multifokálně a/nebo v centrálně lokalizovaných zónách, nemají možnost optimálního chirurgického odstranění, protože by mohlo dojít k trvalému pooperačnímu funkčnímu zhoršení. V tomto případě následuje paliativní radioterapie a/nebo chemoterapie. Pokud lze

nádor odstranit, může po operaci následovat adjuvantní radioterapie nebo chemoterapie, optimálně v kombinaci. U GBM se používá adjuvantní konkomitantní chemoradioterapie s temozolomidem. U pacientů s glioblastomem je chirurgická resekce spojená s delším přežitím, jak u mladších, tak i u starších. Pooperační radioterapie má příznivý vliv na celkové přežití a přežití bez progresu. Chemoterapie s látkami na bázi nitrosourei jako doplněk pooperační radioterapie zvyšuje medián přežití o 2 měsíce (Filippini *et al.*, 2008; Frappaz *et al.*, 2003; www.linkos.cz, 2011).

### **1.2.2.2 Moderní experimentální přístupy**

I přes mohutný rozvoj prediktivní onkologie zůstávají nádory CNS velmi obtížně léčitelnou skupinou onkologických onemocnění. Existuje jen velmi málo prediktivních markerů, na základě kterých by byla prováděna rutinní léčba. Z tohoto důvodu se hledají nové způsoby a možnosti identifikace takovýchto markerů. Navržené strategie pro zlepšení léčby zahrnují antiangiogenní léčiva a látky, či blokující onkogenní signalizační dráhy. Tyto nové látky jsou potřebné i z toho důvodu, že velké procento glioblastomů vykazuje extrémní rezistenci vůči klasickým chemoterapeutikům – např. 69% GBM je rezistentní vůči paclitaxelu, 75% vůči SN38 (7-ethyl-10-hydroxycampotecin) a 38% vůči vincristinu (Haroun *et al.*, 2002; Schor, 2009). V preklinických a klinických zkouškách byly již použity některé nízkomolekulární inhibitory přenosu signálu. Účinnost těchto agens v monoterapii byla nízká. Ovšem malý soubor pacientů se specifickými genetickými změnami ukazoval příznivou klinickou odpověď k určitým inhibitorům (Sathornsumetee *et Rich*, 2006). Řešením nízké účinnosti mohou být např. tzv. mnohacílové inhibitory kináz a kombinace agens, zasahujících různé mitogenní signální dráhy, které by mohly překonat rezistenci tumoru k léčbě pouze s jedním specifickým inhibitorem. V preklinickém testování byl například testován reverzibilní inhibitor EGFR, erlotinib (Tarceva), avšak výsledky jsou poměrně kontroverzní (Haas-Kogan *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007; Raizer *et al.*, 2010). Dalšími možnostmi jsou inhibitory antiapoptotické PI3K signální dráhy. Nelfinavir je inhibitor, který inhibuje tuto signální dráhu přes Akt a díky němu jsou buňky glioblastomu citlivější na radioterapii a k terapii temozolomidem (Jiang *et al.*, 2007).



**Obr. 6:** Molekulárně genetické aberace a molekulárně cílené terapie maligních gliomů. (Thaker *et* Pollack, 2009)

Dalším z cílů jsou rovněž modulatory apoptózy. Například v chemorezistenci gliomů hraje důležitou roli Bcl-X<sub>L</sub>. Snížení množství tohoto proteinu zvyšuje vnímavost k apoptóze indukované paclitaxelem. Kombinace léčby používající Bcl-xL antisense oligonukleotidy a paclitaxel je slibnou strategií pro zlepšení klinického výsledku u pacientů s GBM (Guensberg *et al.*, 2002).

Ve fázi preklinického či v počátečních fázích klinického zkoušení je i genová terapie. Při této léčbě jsou do nádorové buňky dodávány tumorsupresorové geny, geny indukující apoptózu, nebo se léčbou zvyšuje imunitní antitumorová odpověď. Jako nosič pro vpravení genu do buňky slouží nejčastěji virový vektor (retroviry, adenoviry), jednu z možností představují i neurální kmenové buňky, které mají obrovský migrační potenciál (Hosszú *et al.*, 2006; Klenner, 2002). Testována byla např. genová terapie s využitím genu pro thymidinkinázu (TK1), který je virovým vektorem dopraven do dělících se buněk. Po

podání gancykloviru dochází k jeho přeměně pomocí thymidinkinázy na toxický gancyklovir trifosfát, způsobující inhibici DNA-polymerázy a následnou buněčnou smrt (Culver *et al.*, 1992). Jako nadějně se ukazují transfekce genu pro ligandy receptorů smrti (death receptor ligands) (Ambar *et al.*, 1999), interferony (Eck *et al.*, 2001; Natsume *et al.*, 2000), interleukiny (Benedetti *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002). Léčba může být také cílena na adhezi a invazi nádorových buněk. Jedním z možných terapeutik je molekula N-CAM (neural cell adhesion molecule). Po dodání těchto molekul do gliomových buněk bylo pozorováno snížení invazivity (Blaheta *et al.*, 2006).

Účinnost tohoto léčebného postupu je prozatím diskutabilní. Faktem zůstává, že se dosud nepodařilo překonat hlavní nedostatky genové terapie. Je nutné zvýšit účinnost genové transfekce tak, aby byly zasaženy všechny nádorové buňky a zároveň nedocházelo k zasažení i okolních fyziologických tkání, a zajistit, aby transfekce nebyla reverzibilní (Curtin *et al.*, 2005; Klener, 2002).

Objev dalších léčebných postupů a zpřesnění diagnózy lze rovněž očekávat od nových technologických platforem, využívající microarray (čipové) technologie. Pomocí těchto platforem lze popsat nejenom genetický profil nádorové buňky (aCGH; microarray komparativní genomová hybridizace), ale rovněž i profil expresní (expresní čipy). Předpokládá se, že tato masivní data získaná z vyšetření nádorů CNS by v budoucnu mohla najít skupiny markerů, korelující s prognózou pacientů či predikcí léčby anebo přímo identifikovat nové terapeutické cíle (Kumar *et al.*, 2008).

Přínos pro léčbu nádorů CNS je očekáván rovněž v rámci studie proteomu. Komparativní proteomika mezi zdravým a maligním stavem může být využita k získání profilu charakterizujícího vývoj či progresi nádorového onemocnění. Identifikované proteiny mohou sloužit jako důležité prognostické markery nebo mohou být použity jako nové terapeutické cíle. K separaci, identifikaci, charakterizaci a kvantifikaci se používá nejčastěji elektroforéza, hmotnostní spektrometrie (MS), kapalinová chromatografie-tandem MS, SELDI-TOF (Surface-enhanced Laser Desorption Ionization Time-of-flight) MS a proteinové arrays (Godard *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2008).

Účinnější léčbu může rovněž přinést i lepší pochopení epigenetických změn, podílejících se na vzniku a vývoji nádoru (Kumar *et al.*, 2008). Příkladem je léčba alkylačním agens temozolomidem u pacientů s hypermetylevaným promotorem MGMT genu. U těchto pacientů je léčba úspěšnější než u pacientů s MGMT nemetylovaným promotorem (Eoli *et al.*, 2007; Hegi *et al.*, 2005).

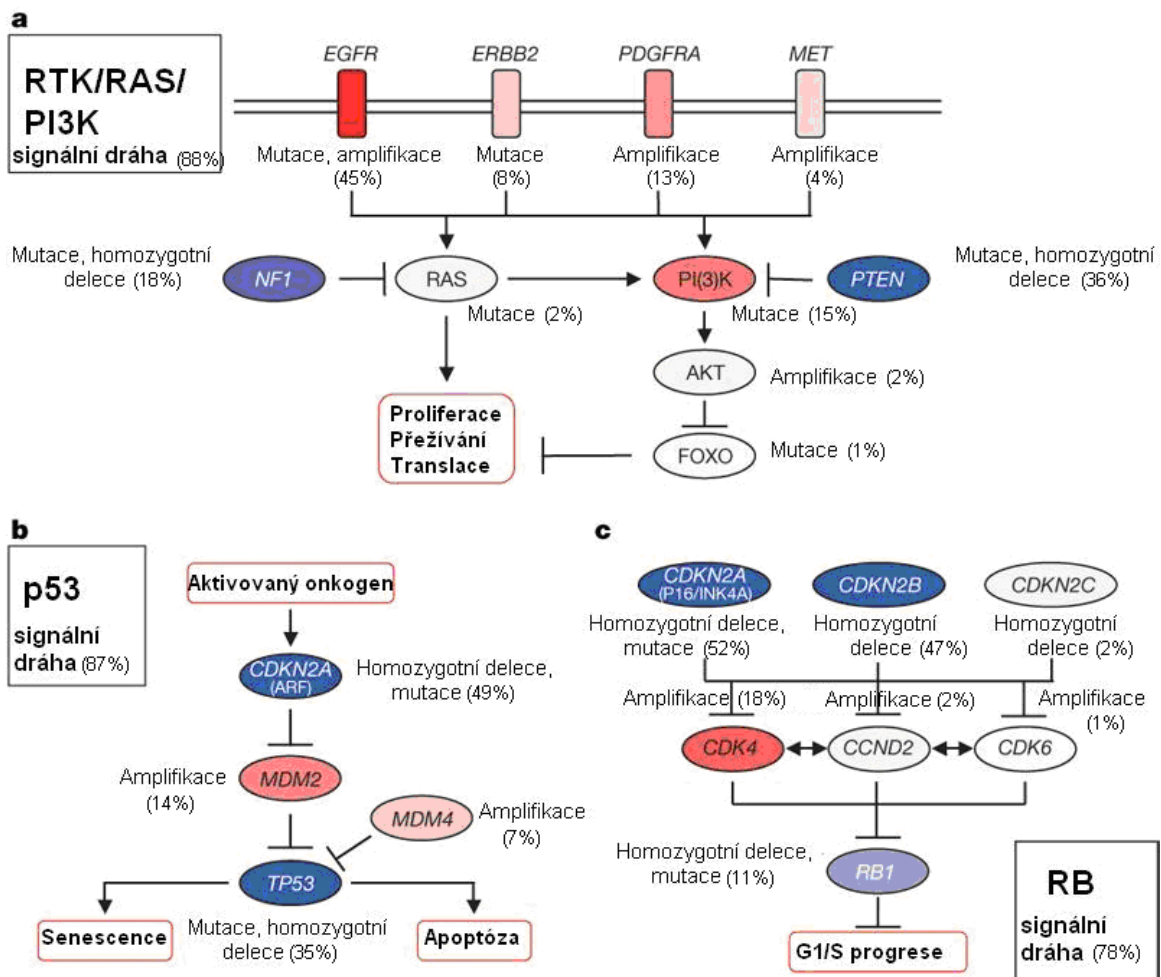


### 1.3 Genetické a cytogenetické změny nacházené u GBM

Úkolem molekulární genetiky a cytogenetiky je popsat spouštěcí mechanismus a proces karcinogeneze, hledat nové možnosti a cíle terapie. Hlubší pochopení molekulárně genetických a genetických mechanismů a jejich významu v tumorigenezi dovolí léčbu nádorů specificky zaměřit a upravit léčebnou strategii přesně podle biologie jednotlivého nádoru. Nepostradatelným počátečním krokem je nutnost zpřesnit taxonomii tumorů na základě jejich genetického profilu, resp. identifikace molekulárně genetických změn u skupin pacientů se stejnou diagnózou, avšak rozdílně reagujícími na léčbu či s odlišným biologickým chováním nádoru. Identifikace těchto skupin povede k lepšímu porozumění biologických procesů, které tvoří základ rozlišení mezi typem a gradem nádoru a poskytnou opěrný bod pro určení role jednotlivých genů v iniciaci a progresi onemocnění (Godard *et al.*, 2003; Hosszú *et al.*, 2006; Venter *et Thomas*, 1991).

U glioblastomů dochází ke genetickým a cytogenetickým změnám (Obr. 7). Například pro sekundárně vzniklý glioblastom je typická mutace TP53 (až 65% sekundárních GBM), doprovázená ztrátou chromozomu 10, příp. 17. Amplifikace EGFR nebývá častá, zatímco běžným jevem jsou přítomnost mutace IDH1, delecí na dlouhých ramenech chromozomů 19 a 13 (19q, 13q), hypermetylace promotoru RB1 genu a overexprese PDGFRA (Cerman *et al.*, 2006; Kleihues *et Ohgaki*, 1999; Ohgaki *et Kleihues*, 2005; Riemenschneider *et Reifenberger*, 2009; Venter *et Thomas*, 1991).

Primární glioblastom se naopak vyznačuje amplifikací genu EGFR (až u 40%), ztrátou chromozomu 10, dále homozygotní delecí CDKN2A a p14, amplifikací CDK4, MDM2 nebo MDM4, mutací RB1 nebo homozygotní delecí a mutací genu PTEN. Ohgaki *et Kleihues* (2005) rovněž popsali mutaci PTEN, vyskytující se téměř výhradně u primárních glioblastomů (Cerman *et al.*, 2006; Ohgaki *et Kleihues*, 2005; Riemenschneider *et Reifenberger*, 2009; Venter *et Thomas*, 1991).



**Obr. 7:** Nejčastější genetické změny ve třech hlavních signálních drahách u glioblastomu. (Upraveno podle McLendon *et al.*, 2008)

### 1.3.1 Chromozomální oblast 9p (LOH 9p)/oblast genu CDKN2A

Delece dlouhého ramene chromozomu 9 postihuje oblast genu CDKN2A (chromozomální oblast 9p21), kódující protein p16. Gen CDKN2A je složen ze 3 exonů. Protein p16 je 16 kD vážící, 156 aminokyselin dlouhý, negativní regulátor buněčného cyklu. Tento protein je zapojen do regulace buněčného cyklu. Protein p16 je inhibitor komplexu CDK4/cyklin D. Váže se na podjednotku tohoto komplexu cyklin-dependentní kinázu 4 a tím jí znemožňuje vazbu na cyklin D. Tato vazba inhibuje kinázovou aktivitu enzymu, nedojde k fosforylaci pRB, nedojde k uvolnění transkripčních faktorů E2F a přechodu z fáze G1 do fáze S. Alternativním splicingem vzniká protein p14. Protein p14 je inhibitorem MDM2, který blokuje označení proteinu p53 ubiquitinem, který jej směřuje do proteazomu k degradaci (Foulkes *et al.*, 1997). Homozygotní delece genu je popisována asi ve 40% případů

glioblastomu a bývá asociována s amplifikací genu EGFR (Ohgaki *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 1994). Delece p16 je častější v primárním glioblastomu (Foulkes *et al.*, 1997).

Protein p16 spolu s proteinem p14 je považován za potenciální regulátor chemo- a radiosenzivity u gliomů. Snížená exprese p16 bývá asociována se zvýšenou citlivostí k antimetabolickým chemoterapeutickým látkám, ale ne k alkylačním agens, antibiotikům, inhibitorům topoizomeráz a antimikrotubulárním látkám (Iwadate *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 2006).

### **1.3.2 Chromozomální oblast 13q (LOH 13q)/oblast genu RB1**

Mezi geny, ovlivňujících buněčný cyklus patří tumor supresorový gen RB1, lokalizovaný na chromozomu 13, v oblasti 13q14. Kóduje jaderný fosfoprotein (pRB), který se podílí na regulaci řady buněčných funkcí, mezi které patří průběh buněčného cyklu, diferenciace, senescence a apoptóza. Je důležitý pro přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu pomocí interakce s transkripčními faktory z E2F rodiny. Protein RB se během buněčného cyklu nachází v hyperfosforylovaném nebo hypofosforylovaném stavu, k fosforylaci a defosforylaci dochází na serinových a threoninových zbytcích, čímž je regulována aktivita pRB. V hypofosforylovaném stavu pRB váže E2F faktory a nedochází tedy k transkripci cílových genů. Po fosforylaci, zprostředkované komplexem D-cyklin/cyklin-dependentní kináza 4/6, jsou E2F uvolněny a spouští transkripci genů, které jsou vyžadovány pro S fázi buněčného cyklu. Inaktivace genu RB1 či změny v pRB fosforylaci jsou zapojeny v procesu tumorigeneze (Herschkowitz *et al.*, 2008; Mathivanan *et al.*, 2007; Rosypal, 2000; Sun *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005).

Inaktivační mutace genu RB1 se vyskytuje u 5-12% glioblastomů. Většina těchto mutací má za následek vznik zkráceného pRB proteinu, který nevstupuje do jádra. Deaktivační metylace promotoru je častější u sekundárních (43%) než u primárních (14%) glioblastomů (Ohgaki *et al.*, 2005).

### **1.3.3 Chromozom 10**

Monozomie či ztráta jednoho z ramen chromozomu 10 se vyskytuje v 60-90% glioblastomů. Při parciální deleci jsou nejčastěji deletované tři chromozomální regiony, a to 10p14-pter, 10q23-24 a 10q25-qter. V této oblasti se pravděpodobně nachází geny

zodpovědné za přechod nádoru do vyššího stupně malignity (Cerman *et al.*, 2006; Collins, 1999; Ohgaki *et Kleihues*, 2005; Rasheed *et al.*, 1999). Jedním z možných genů zapojených v progresi do vyššího stádia je tumorsupresorový gen PTEN, lokalizovaný v oblasti 10q23.3 (Knobbe *et al.*, 2002). PTEN kóduje 47kD velký, 403 aminokyselin dlouhý protein s fosfatázovou aktivitou. PTEN je antagonistou fosfoinositol-3-kinázy (PI3-kináza). Jeho substrátem je především fosfolipid fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PI-3,4,5-P<sub>3</sub>), který PTEN defosforyluje na třetí pozici. Při aktivaci receptorů růstovými faktory jej PI3-kináza vytváří fosforylací PI-4,5-P<sub>2</sub>, což vede k aktivaci Akt signální dráhy a inhibici apoptózy a stimulaci proliferace. PTEN tak hraje významnou roli v potlačení buněčného růstu, inhibici G<sub>1</sub>/S přechodu. K inhibici přechodu do S fáze dochází především zvýšením exprese inhibitoru cyklin dependentních kináz, proteinu p27 (Goberdhan *et Wilson*, 2003; Rameh *et Cantley*, 1999; Yamada *et Araki*, 2001).

Delece oblasti 10q23, mutace genu PTEN či epigenetické změny v tomto regionu bývají nalézány přibližně u 60 % GBM. U glioblastomů a astrocytomů je delece nebo mutace v PTEN genu považována za negativní prognostický faktor s kratší dobou přežití pacientů (Koul, 2008; Li *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2001).

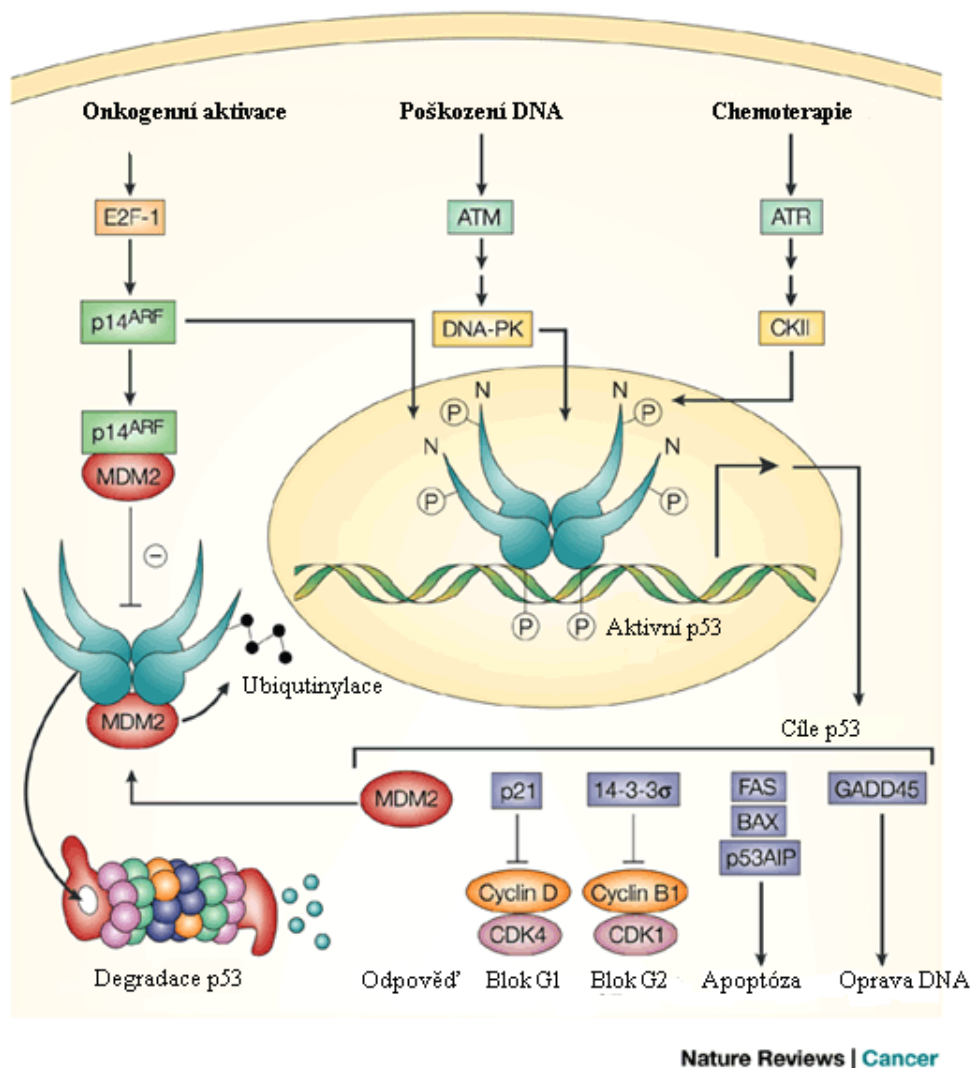
#### **1.3.4 Chromozomální oblast 17p (LOH 17p) / oblast genu TP53**

Na chromozomu 17, v oblasti 17p13.1 je lokalizován tumorsupresorový gen TP53. Tento gen je dlouhý 20kb a kóduje 53kD jaderný fosfoprotein – p53, složený z 393 aminokyselin (Miyagami *et al.*, 1998; Ohgaki *et Kleihues*, 2007).

Protein p53 hraje hlavní roli v odpovědi buňky na poškození DNA (Obr. 8). Funguje jako transkripční faktor, který je exprimován v případě buněčného stresu, např. při poškození DNA, a inhibuje buněčnou proliferaci a replikaci či iniciuje DNA opravné procesy. Po syntéze v cytoplazmě je p53 transportován do jádra. V nestresových podmínkách je transportován zpět do cytoplazmy, kde dochází k jeho degradaci prostřednictvím 26S proteazomu. Při stresu dochází k zastavení exportu a p53 se hromadí v jádře, kde uplatňuje své tumor supresorové funkce. Protein p53 indukuje expresi inhibitoru cyklin dependentní kinázy p21, a tak může regulovat přechod z fáze G<sub>1</sub> do S fáze buněčného cyklu. Jeho kontrolní aktivita se uplatňuje rovněž v G<sub>2</sub>/M kontrolním bodě (Lee *et al.*, 2006; Momand *et al.*, 2005; Ohgaki *et Kleihues*, 2005; Ranuncolo *et al.*, 2004; Sang *et al.*, 2000).

Funkce p53 je regulována různými mechanismy, mezi nejdůležitější zpětnovazebné regulační proteiny patří MDM2 a p14 (ARF, alternativní produkt CDKN2A genu). MDM2 inhibuje transkripční aktivitu p53, váže na něj ubiquitin a tím tento protein určuje k degradaci (Ranuncolo *et al.*, 2004).

U řady nádorů, například u karcinomu plic (Miller *et al.*, 1992), prsu nebo tlustého střeva (Nigro *et al.*, 1989), včetně glioblastomu je p53 mutovaný nebo deletovaný. Nejčastěji se jedná o bodovou mutaci vedoucí k záměně aminokyselin v konzervativním regionu. Bodová mutace TP53 bývá nalézána přibližně u 45% glioblastomů. Nejčastěji se jedná o změnu kodonu, vedoucí k vzniku předčasného stop kodonu a poruchám sestřihu (splicing). Protein p53 může být deregulován nejen změnou v expresi (delece, bodová mutace), ale i na úrovni dráhy TP53/MDM2/p14. Příčinou nefyziologické deregulace je amplifikace genu MDM2 (u 10% gliomů) či ztráta exprese proteinu p14 (76% gliomů). Ztráta chromozomální oblasti 17p pravděpodobně reprezentuje časnou událost ve vývoji gliálního tumoru (Chung *et Seizinger*, 1992; Klener, 2002; Ohgaki *et Kleihues*, 2005; Venter *et Thomas*, 1991).



**Obr. 8:** Odpověď p53 na onkogenní aktivaci, poškození DNA a chemoterapii.  
(Upraveno podle Bullock *et Fersht*, 2001)

### 1.3.5 Gen MDM2

MDM2 (murine double minute 2) onkogen je lokalizovaný na chromozomu 12, v oblasti 12q13-q14. Gen MDM2 kóduje protein složený ze 491 aminokyselin, který působí jako E3 ubiquitin ligáza, jejímž cílem je řada buněčných proteinů. K nejdůležitějším patří tumor supresorové proteiny p53 a pRB. MDM2 přidává molekuly ubiquitinů na lysinové zbytky proteinu p53. Takto označený p53 je exportován do cytoplazmy a degradován v 26S proteozómu. Tímto MDM2 negativně reguluje apoptózu zprostředkovanou p53. Kromě toho se může MDM2 přímo vázat na N-konec transkripční domény p53, a tak může inhibovat jeho transkripční aktivitu. K nadměrné inaktivaci p53 prostřednictvím MDM2 dochází v mnoha lidských nádorech, MDM2 je tedy považován za potenciální terapeutický

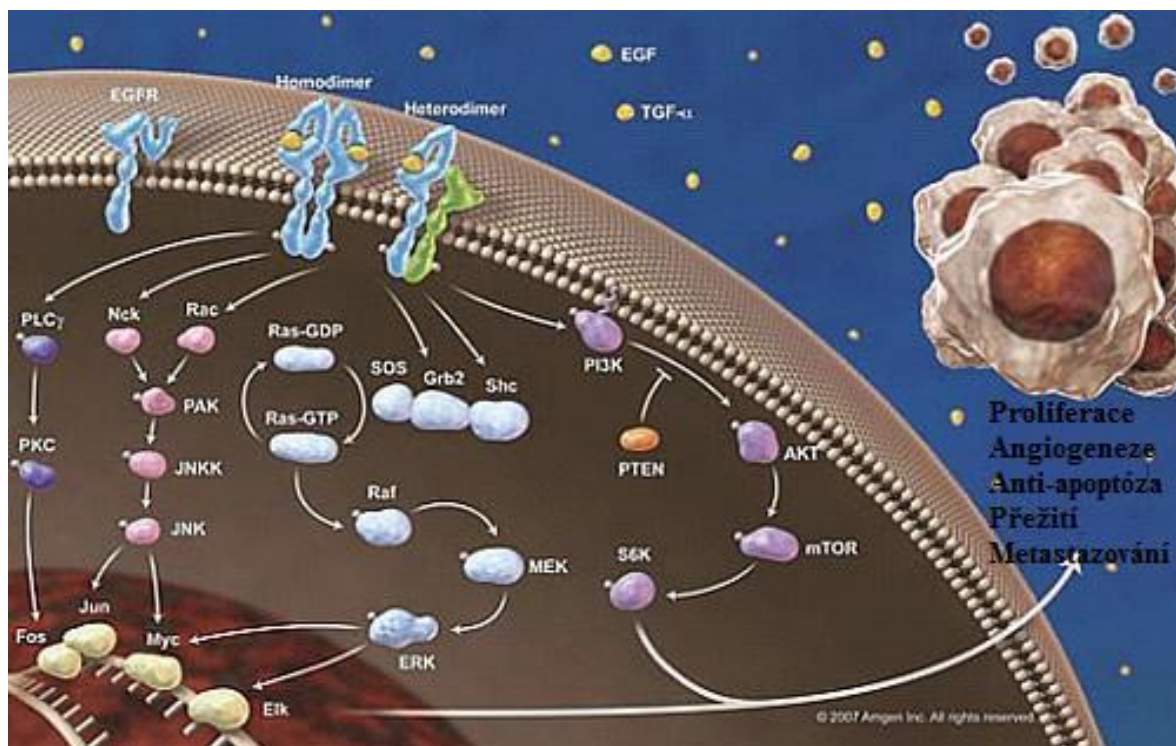
cíl, jehož inaktivací by tumor supresorová aktivita p53 mohla být v těchto nádorech znovu obnovena (Han *et al.*, 2008; Momand *et al.*, 2005; Ohgaki *et Kleihues*, 2005).

Amplifikace MDM2 je přítomna v méně než 10% glioblastomu. Naproti tomu overexprese byla pozorována asi v 50% primárních glioblastomů (v méně než 10% sekundárních glioblastomů) (Ohgaki *et Kleihues*, 2005).

### 1.3.6 Gen EGFR

Gen EGFR (HER-1; erbB-1; receptor pro epidermální růstový faktor) je lokalizován na chromozomu 7, v oblasti 7p12 a jeho velikost je 186 kb. Kóduje 170 kD transmembránový protein EGFR, který je jedním ze čtyř známých členů erbB rodiny (HER1, HER2, HER3 a HER4) tyrozinkinázových receptorů. Tyto receptory se skládají z extracelulární domény, která slouží pro vazbu ligandu, transmembránové lipofilní domény a intracelulární, cytoplazmatické domény s tyrozinkinázovou aktivitou. Přirozeným aktivačním ligandem tohoto receptoru je například epidermální růstový faktor (EGF), transformující růstový faktor alfa ( $TGF\alpha$ ), „heparin-binding EGF-like“ růstový faktor (HB-EGF) (Fenstermaker *et Ciesielski*, 2007; Liang *et al.*, 2008; Sirák *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2002).

EGFR hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu, buněčné proliferace, diferenciaci a buněčného přežívání epidermálních tkání. Receptor je aktivován vazbou ligandu, po které dochází k homodimerizaci nebo k heterodimerizaci EGFR s jiným ze členů erbB rodiny. Po dimerizaci dochází k autofosforylaci tyrozinových zbytků na C-konci intracelulární tyrozinkinázové domény. Fosforylace spouští intracelulární signální dráhy, například Ras/Raf/MAPK a PI3K/Akt dráhy (Obr. 9) (Lee *et al.*, 2006; Sirák *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2002).



**Obr. 9:** Signální dráhy spuštěné aktivovaným receptorem a jejich vliv na chování buňky. (www.bio-itworld.com, 2011)

Exprese EGFR je přísně regulována, zvýšení aktivity může vést k progresi buněčného cyklu, urychlení buněčné proliferace, nádorového růstu, diferenciace a angiogeneze, snížení citlivosti nádorových buněk k cytotoxické léčbě a radioterapii. Mechanismy, zvyšující aktivitu EGFR jsou overexprese genu, zvýšená aktivace receptoru zvýšenou koncentrací ligandu, amplifikace EGFR, aktivační mutace nebo ztráta intracelulárních regulačních mechanismů (Sirák *et al.*, 2008).

Amplifikace EGFR je u glioblastomů často doprovázena ztrátou chromozomu 10 a delecí genu CDKN2A na chromozomu 9 (Cerman *et al.*, 2006; Chung *et Seizinger*, 1992). Další častou aberací EGFR genu je jeho aktivační mutace, kdy je vytvářen zkrácený produkt EGFRvIII. Tato aberace vede ke konstitutivní aktivaci receptoru i bez přítomnosti ligandu (Huang *et al.*, 2007; Ohgaki *et Kleihues*, 2005; Schor, 2009). EGFR amplifikace se vyskytuje až u 40-50% primárních GBM (Chung *et Seizinger*, 1992; Ohgaki *et Kleihues* 2005; Schor, 2009). Nádory s abnormální expresí EGFR jsou charakterizovány zvýšenou agresivitou onemocnění, horším přežitím, rozvojem vzdálených metastáz, horším stupněm nádorové diferenciace a sníženou citlivostí k cytotoxické léčbě a radioterapii (Sirák *et al.*, 2008). Rovněž kolektiv autorů Schlegel *et al.* (1994) prokázali, že doba do rekurence



glioblastomu je u pacientů s EGFR amplifikací významně kratší než u pacientů bez této alterace. Přítomnost amplifikace a nadměrné exprese EGFR však otevírá možnost léčby nízkomolekulárními inhibitory EGFR (např. gefitinib, erlotinib), které se k léčbě některých solidních nádorů již v rutinní praxi používají (Haas-Kogan *et al.*, 2005).

### 1.3.7 Geny PDGF/R

Geny pro PDGF (Platelet-derived growth factor, destičkový růstový faktor) a PDGFR (receptor pro destičkový růstový faktor) jsou lokalizované na různých chromozomech. Gen PDGFRA je lokalizován v chromozomální oblasti 4q12, PDGFRB v 5q33.1, PDGFA v 7p22, PDGFB v 22q13.1, PDGFC v 4q32, PDGFD v 11q22.3 (Andrae *et al.*, 2008).

PDGF je dimer polypeptidových řetězců A, B, C a D. Mohou vytvářet heterodimer (PDGF-AB) nebo homodimery (PDGF-AA, BB, CC, DD). Receptory pro tento růstový faktor známe dva, a to PDGFR- $\alpha$  a  $-\beta$ . PDGFR- $\alpha$  váže řetězce A, B, C, PDGFR- $\beta$  váže řetězce B a D. PDGF-B je exprimován hlavně v buňkách cévního endotelu, megakaryocytech a neuronech; A a C v epiteliálních a svalových buňkách a neuronálních progenitorech; D ve fibroblastech. PDGFR- $\alpha$  i  $-\beta$  je exprimován mezenchymálními buňkami (Andrae *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007).

PDGF hrají klíčovou roli během vývoje, ale jejich podíl na normálních fyziologických funkcích není zatím zcela objasněn. Při vývoji mají vliv na správnou angiogenezi, alveologenezi, morfogenezi klků a vlasů, vývoj varlat a spermatogenezi, oligodendroglionezi a glomerulogenezi. Zvýšená aktivita je spojována s některými chorobami a patologickými podmínkami. Nemoci, ve kterých je PDGF zapleten lze rozdělit do tří skupin: nádory, cévní onemocnění, fibrózy (Andrae *et al.*, 2008).

Vazba ligandu k receptoru vede k dimerizaci, která spouští různé signální dráhy. Při dimerizaci dochází k autofosforylaci receptoru na tyrozinových zbytcích intracelulární domény. Tím je aktivovaná kináza, která dále fosforyluje příslušný substrát. PDGF spouští např. Ras/MAPK, PI3K a PLC- $\gamma$  signální dráhu. Tyto dráhy hrají roli v mnoha buněčných odpovědích. MAPK dráhou je spouštěna genová transkripce, vedoucí ke stimulaci buněčného dělení, diferenciaci a migraci. Při aktivaci PI3K dráhy je podporována reorganizace aktinových filament, buněčné dělení a inhibována apoptóza. PLC- $\gamma$  aktivace vede k mobilizaci buněčného  $\text{Ca}^{2+}$  a aktivaci protein kinázy-C (PKC), která podporuje buněčné dělení a motilitu (Li *et al.*, 2007).

Nádorové buňky se vyznačují nezávislostí na růstových signálech. Je pravděpodobné, že nádory (včetně gliomů) tuto vlastnost získávají prostřednictvím autokrinní stimulace růstu, která zahrnuje PDGF-B/PDGFR- $\beta$  signalizaci. Tato autokrinní stimulace má pravděpodobně vliv i na invazivitu a metastazování epitelálních nádorů (Andrae *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007).

U PDGF/R byly popsány alterace, které vedou k overexpresi nebo změně funkce genového produktu v nádorové buňce. Je to amplifikace, translokace (při které se gen pro růstový faktor dostane pod kontrolu promotoru genu pro kolagen typu 1 u fibroblastů kůže a je spolu s kolagenem 1 exprimován kontinuálně) nebo aktivační mutace. Amplifikace PDGFRA se vyskytuje až u 65% GBM (Andrae *et al.*, 2008; Hui *et al.*, 2001; Ruano *et al.*, 2006).

Inhibitory PDGFR signalační dráhy, jako například imatinib, by mohly přinést novou léčebnou strategii pro high-grade gliomy (Newton, 2003). Další možností terapie jsou neutralizační protilátky proti ligandům a receptorům (Andrae *et al.*, 2008).

### 1.3.8 Gen IDH1

Gen IDH1 je lokalizovaný na chromozomu 2, v oblasti 2q33. Kóduje NADP<sup>+</sup>-dependentní izocitrát dehydrogenázu 1, která se nachází v cytoplasmě, peroxizomech a endoplazmatickém retikulu. Enzym IDH1 katalyzuje oxidativní dekarboxylaci izocitrátu na  $\alpha$ -ketoglutarát ( $\alpha$ KG), při které dochází k produkci NADPH (Bleeker *et al.*, 2010; Reitman *et al.*, 2010). Produkce NADPH je nutná pro regeneraci redukováného glutationu, který funguje v savčích buňkách jako antioxidant a podporuje rezistenci k apoptóze. Jeho snížené množství v buňce vede k oxidativnímu stresu, který způsobuje poškození DNA a indukuje apoptózu (Bleeker *et al.*, 2010). Dalším důsledkem IDH1 mutace je získání neomorfické enzymatické aktivity, kdy je  $\alpha$ KG redukován na R(-)-2-hydroxyglutarát (2HG). Tato enzymatická aktivita se může podílet na vývoji nádoru.  $\alpha$ KG inhibuje degradaci transkripčního faktoru HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ ) (Reitman *et al.*, 2010), zapojeného v progresi tumoru (Sharma, 2008). Současně dochází k akumulaci 2HG, která pravděpodobně vede ke zvýšení úrovně oxidativního stresu v mutantních nádorových buňkách (Labussiere *et al.*, 2010).

Mutace IDH1 jsou detekovány u různých typů gliomů, především u low-grade gliomů a sekundárních glioblastomů (70-80%) (Balss *et al.*, 2008; Ichimura *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009). Typickou mutací IDH1 u gliomů je R132H mutace (až 90% ze všech mutací)

(Reitman *et al.*, 2010). Mutace IDH1 jsou u jiných nádorů vzácné. Jedna specifická mutace (R132C) byla nalezena u nádoru tlustého střeva (Sjoblom *et al.*, 2006). Mutace IDH1 je nacházena také u akutní myeloidní leukemie (Mardis *et al.*, 2009). V nádorech prsu, plic, kolorekta nebo melanomu nebyla mutace IDH1 nalezena (Bleeker *et al.*, 2009).

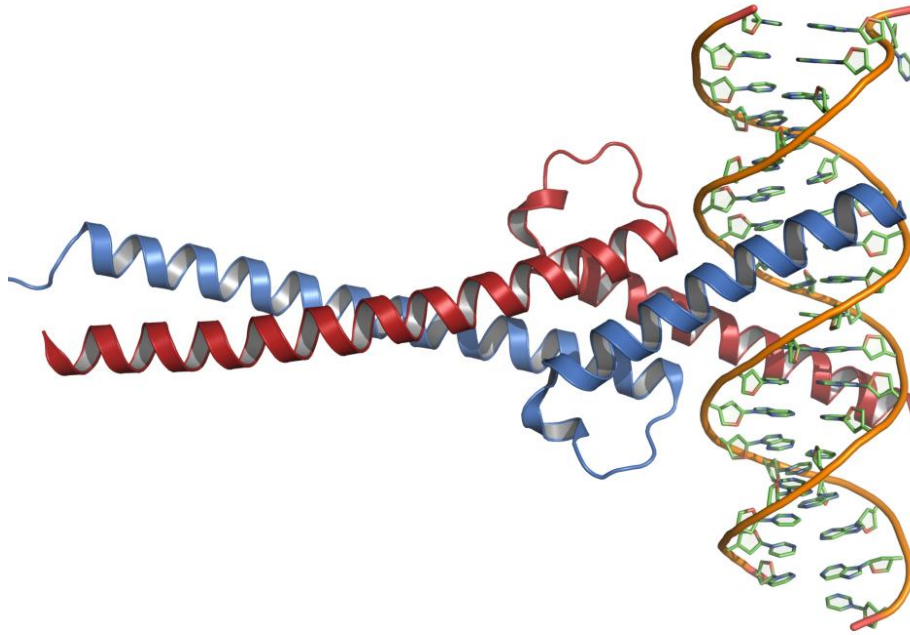
Mutace, postihující gen pro izocitrát dehydrogenázu 2 (IDH2), která je lokalizovaná v mitochondriích, byly popsány u gliomů, ale v nižší frekvenci (Hartmann *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009).

### 1.3.9 Gen C-myc

Gen C-myc (lidský homolog genu *v-myc* ptačí myelocytomatózy) je lokalizován v chromozomální oblasti 8q24.12-q24.13. Patří do rodiny Myc onkogenů, společně s geny B-myc, L-myc, N-myc a S-myc. Neoplastický potenciál byl prokázán pouze u C-myc, L-myc a N-myc (Gardner *et al.*, 2002).

Hlavní produkt genu C-myc je 439 aminokyselin dlouhý, 64 kDa vážící protein. Při alternativní translaci z jiných iniciačních míst vzniká delší protein, tzv. p67 Myc a kratší forma označovaná jako MycS. Protein C-myc je transkripční faktor, regulující genovou expresi (Gardner *et al.*, 2002).

C-myc obsahuje tzv. Myc boxy. Jsou to konzervované sekvence, nacházející se i u blízké příbuzných proteinů N-myc a L-myc. Tyto N-terminální domény jsou označovány jako transaktivační a tvoří je 140 aminokyselin. C-terminální oblast obsahuje dimerizační motiv bohatý na bazické aminokyseliny. Pomocí tohoto takzvaného leucinového zipu (leucine zipper) helix-loop-helix (HLH LZ) dochází k homotypické nebo heterotypické dimerizaci s jiným proteinem, obsahujícím HLH LZ. Dimerizačním partnerem C-myc proteinu je protein Max nebo Mad (Obr. 10) (Dang, 1999; Gardner *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2003).



**Obr. 10:** Struktura C-myc (červený) proteinu v komplexu s proteinem Max (modrý). Oba proteiny jsou navázány na DNA.

(www.creative-biomart.com, 2011)

Exprese C-myc je v normálních buňkách přísně regulována prostřednictvím externích signálů (růstové faktory, kontakt s extracelulární matrix) a buněčného cyklu. Jeho exprese je potlačena signály inhibujícími růst. Buňky v klidové fázi exprimují na rozdíl od dělících se buněk pouze malé množství C-myc. Po stimulaci klidové buňky pomocí růstových signálů výrazně vzroste exprese C-myc a ta přetrvává v buňce do rozdělení na klidové dceřiné buňky. Abnormální a ektopická overexprese C-myc v buňkách aktivuje ochrannou signální dráhu vedoucí k apoptóze. To je možné například prostřednictvím indukce p19/p14 a ARF/MDM2/p53-dependentní dráhy nebo aktivací receptorů smrti (Dang, 1999; Nesbit *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2008).

C-myc se podílí na přechodu z klidové G0 fáze do G1 a z fáze G1 do S. Způsoby, kterými se podílí na řízení buněčného cyklu, jsou různé. Většina studií je zaměřena na vliv proteinu C-myc na regulační proteiny, které se na těchto přechodech podílejí. Těmi jsou cyklin-dependentní kinázy (CDK), cykliny a inhibitory cyklin dependentních kináz (CKI). C-myc je zapojen v indukci transkripce genu pro cyklin D1 a D2, cyklin E, CDK4 a fosfatázu cdc25A (Dang, 1999; Gardner *et al.*, 2002).

V nádorových buňkách je gen C-myc exprimován nefyziologicky. To je následkem různých genetických aberací. Deregulovaná exprese má významnou úlohu v procesu vývoje tumoru (Gardner *et al.*, 2002).

Aktivace genu C-myc, která se podílí na vývoji tumoru, je možná několika mechanismy. Je to například chromozomální translokace. Typickým případem je translokace u Burkittova lymfomu, kdy se gen pro C-myc dostane pod regulaci promotoru pro imunoglobuliny. Ty jsou v B-lymfocytech kontinuálně transkribovány a spolu s nimi dochází k transkripci i C-myc genu. Další možností je genová amplifikace, zvyšující počet kopií genu a tím i jeho expresi. Jinou možností je odstranění 3'UTR destabilizující sekvence (zvýšená životnost mRNA), inserce retrovirů do přilehlé oblasti k Myc lokusu (exprese řízená virovými regulačními sekvencemi), stabilizace Myc proteinu prostřednictvím Ras nebo bodová mutace (především v transaktivační doméně, vedoucí ke zvýšení životnosti proteinu) (Gardner *et al.*, 2002).

Amplifikace a overexprese C-myc je nalézána u různých tumorů, včetně karcinomu prostaty (Jenkins *et al.*, 1997), prsu (Chrzan *et al.*, 2001) a tlustého střeva (Yang *et al.*, 1996). Dále je C-myc amplifikovaný nebo overexprimovaný u glioblastomů a meningeomů (Chung *et Seizinger*, 1992).

U gliomů koreluje C-myc exprese s gradem onemocnění. Nízká exprese je nalézána u grade I a II, naopak u grade III a IV je exprese vysoká (Herms *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2008).

### **1.3.10 Gen N-myc**

N-myc je onkogen lokalizovaný na chromozomu 2, v oblasti 2p24, patří do rodiny Myc transkripčních faktorů. Produkt N-myc genu je jaderný protein s 38% shodou v aminokyselinovém složení s C-myc. Signální dráha aktivovaná prostřednictvím N-myc, vedoucí k buněčné proliferaci a progresi nádoru je pouze částečně objasněna (Hashimoto *et al.*, 1989; Matthay, 2001).

N-myc řídí buněčnou proliferaci nebo vede buňku do apoptózy. Porušení apoptotické signalizace vycházející z N-myc overexprese je pravděpodobně nezbytné pro N-myc-zprostředkovanou onkogenezi. Současné studie ukazují, že gen pro kaspázu 8 (CASP8) je deletován, nebo preferenčně umlčován pomocí metylace v tumorech vykazujících N-myc amplifikaci, tím pravděpodobně dochází k inaktivaci Fas apoptotické signální dráhy. Je také pravděpodobné, že N-myc protein downreguluje inhibitory proliferace endoteliálních

buněk a tím podporuje angiogenezi. Silná exprese N-myc může transformovat normální savčí buňky, ale pouze v kooperaci s jiným onkogenním stimulem, jako je například mutovaný Ras (Matthay, 2001).

N-myc má zásadní roli při proliferaci neuronálních prekurzorů a je nezbytný pro správný vývoj mozečku. Při delecí genu docházelo u pokusných modelů k významnému zmenšení mozečkového a mozkového kortexu, poruchám chování a jiným abnormalitám. Jedním z klíčových regulátorů N-myc při vývoji mozku je signální dráha Sonic hedgehog (Shh). Právě tato signální dráha je zapojena i do vývoje meduloblastomu. Přesný mechanismus, kterým podporuje proliferaci a tumorigenezi však není znám. Shh indukuje regulátory buněčné progresse, DNA replikace a buněčné diferenciaci. Jedním z nich je gen kódující N-myc. N-myc může indukovat expresi cyklinu D1 a D2 a reprimuje expresi inhibitorů cyklin-dependentních kináz. Dalším mediátorem ovlivňujícím neurogenezi je signální dráha N-myc/DLL3. V tomto případě je DLL3 přímý transkripční cíl N-myc. Deregulace N-myc je spojena s tumorigenezí mozku (Oliver *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2009).

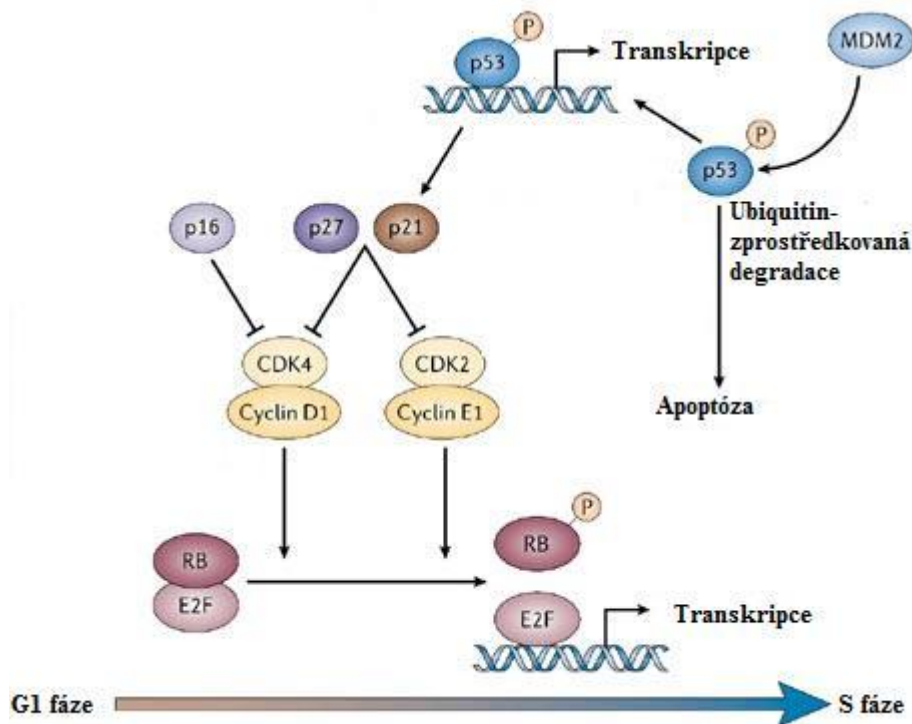
N-myc je amplifikován nebo overexprimován v maligních gliomech a rovněž v meduloblastomech, astrocytomech, meningeomech a především v neuroblastomech, pro které je amplifikace N-myc typická (asi ve 40%) a je významně spojená s pokročilým stupněm nádoru a rychlou progresí, nezávislou na věku a stupni tumoru (Bagatell *et al.*, 2009; Brodeur *et al.*, 1984; Seeger *et al.*, 1985; Venter *et al.*, 1991).

### 1.3.11 Cyklin D1

Gen pro cyklin D1 (CCND1) je lokalizován na chromozomu 11, v oblasti 11q13. Cykliny fungují jako alosterické regulační podjednotky pro cyklin-dependentní kinázy (CDK) a samy o sobě nemají žádnou prokázanou enzymatickou aktivitu. CDK jsou v buňce přítomné během celého buněčného cyklu a jejich aktivita je řízená prostřednictvím cyklicky se měnící přítomnosti cyklinů. Po asociaci s příslušnou CDK se spouští přechod přes jednotlivé fáze buněčného cyklu (Alberts *et al.*, 1998).

Rodina cyklinů D obsahuje 3 zástupce: cyklin D1, D2 a D3. Jedná se o specifické cykliny, které asociují s CDK4 a CDK6 a umožňují přechod přes kontrolní bod během G1 fáze. Dále se podílí na přechodu G1/S (Obr. 11). Ve většině buněk je exprese více než jednoho typu cyklinu D. Jejich exprese a akumulace závisí na přítomnosti extracelulárních mitogenních faktorů. Nejlépe pochopená je regulace cyklinu D1, která je zprostředkována pomocí Ras signální dráhy. Po mitogenním stimulu buňky spouští tyrozinkinázový

receptor následnou signální dráhu zahrnující Ras-Raf-MEK-ERK, která vede k transkripci cyklinu D1. Ten poté asociuje s CDK a tak ji aktivuje. Hlavní funkcí komplexu cyklin D1/CDK4 je fosforylace retinoblastomového proteinu, pRB, čímž dochází k přechodu G1/S. K přechodu z G1 fáze dochází rovněž prostřednictvím inaktivace inhibitorů CDK jako p27<sup>KIP1</sup> nebo p21<sup>CIP1</sup> (Herschkowitz *et al.*, 2008; Kim *et Diehl*, 2009; Kowalczyk *et al.*, 2004; Sumrejkanchanakij *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2006).



**Obr. 11:** Přechod z G1 fáze do S fáze.

(Upraveno podle Kondo *et al.*, 2006)

V lidských nádorech převládá overexprese cyklinu D1 nad overexpresí ostatních cyklinů D. Proč tomu tak je, je zatím nejasné. Nadměrná exprese cyklinu D1 je pozorována například v lymfomu plášťových buněk (mantle cell lymphoma) (Jares *et al.*, 2007), nemalobuněčném nádoru plic (Jin *et al.*, 2001), karcinomu prsu (Barnes *et Gillett*, 1998) aj. Zvýšená aktivita cyklinu D1 je způsobena několika mechanismy, které zahrnují amplifikaci genu, translokaci genu k jinému promotoru, genomické alterace, posttranskripční regulace a posttranslační proteinovou stabilizaci (Kim *et Diehl*, 2009).

Genová amplifikace CCND1 je pozorována v různých typech nádorů, např. rakovina prsu, hlavy a krku, hypofýzy (Kim *et al.*, 2009).

Aberantní jaderná akumulace cyklinu D1/CDK4 má vliv na neoplastickou transformaci. Při normálním buněčném cyklu se komplexy cyklin D1/CDK4 pohybují mezi jádrem a cytoplazmou. Po přechodu G1/S je cyklin D1 rychle fosforylován pomocí GSK3 $\beta$  a treoninu-286, čímž dojde ke spuštění CMR1-dependentního jaderného exportu. Cyklin je následně poly-ubiquitylován a degradován ve 26S proteazomu. Mutantní cyklin D1, který odolává fosforylaci a následné degradaci transformuje buňky *in vitro* a *in vivo*. Mutace, které mají přímý vliv na jaderný export a proteolýzu, byly nalezeny v lidských nádorech (Kim *et al.*, 2009; Pontano *et al.*, 2008; Sumrejkanchanakij *et al.*, 2003).

Komplex cyklin D1/CDK4 je možným cílem protinádorových léčiv. Jako slibný cíl se ukazuje u lymfomu pláštěvých buněk. Ačkoliv nebyly zatím objeveny žádné inhibitory, které mají za cíl přímo cyklin D1, je možné zapojit do léčby například modulaci aktivity GSK3 $\beta$  (Kim *et al.*, 2009; Pontano *et al.*, 2008).

U 15% maligních gliomů (u glioblastomů to může být až v 50% případů) je amplifikovaný gen pro cyklin dependentní kinázu 4. Tento gen je lokalizován na chromozomu 12, v oblasti 12q13-q14 (Cerman *et al.*, 2006).

### 1.3.12 Gen BCR

LOH 22q je přítomná u nádorů mozku, například u meningeomů (40-70%) (Akagi *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2010), a také glioblastomů (Kanu *et al.*, 2009).

Gen BCR (breakpoint cluster region) je lokalizován na dlouhém rameni chromozomu 22 (22q11) a kóduje protein, který obsahuje několik domén, z nichž každá má určitou enzymatickou funkci. Celý gen má velikost 130 kb a obsahuje 23 exonů. Přepisem vznikají 2 transkripty o délce 4,5 a 7,0 kb (Laurent *et al.*, 2001; Radziwill *et al.*, 2003; Stam *et al.*, 1985).

Byly popsány některé BCR-příbuzné geny, BCR2, BCR3 a BCR4. Všechny jsou lokalizované na chromozomu 22, v oblasti 22q11. Normální gen BCR kóduje dva hlavní proteiny s  $M_r$  160 000 a  $M_r$  130 000 (Croce *et al.*, 1987; Laurent *et al.*, 2001).

Bcr asociuje s XPB proteinem. Ten hraje roli při opravách DNA, iniciaci transkripce a regulaci buněčného cyklu (Laurent *et al.*, 2001; Maru *et al.*, 1999).



BCR se účastní translokace t(9,22), vzniku tzv. Filadelfského (Ph) chromozomu. Výsledkem je fúzní protein bcr-abl, se stabilní tyrozin-kinázovou aktivitou, iniciující proliferaci hematopoetických buněk. Jedná se o první identifikovanou translokaci, asociovanou se specifickým maligním onemocněním, chronickou myeloidní leukémií (CML) (nalézán asi u 95% pacientů s CML). V menším množství případů je nacházen tento aberantní chromozom i u akutní lymfoblastické leukemie a akutní myeloidní leukémie, případně u některých typů myelomů a lymfomů (Hermans *et al.*, 1987; Chan *et al.*, 1987; Melo, 1996).

Gen	Mechanismus	Frekvence [%]
CDKN2A	Delece	40
RB1	Mutace, delece	5-12
Chromozom 10	Delece	60-90
PTEN	Mutace, delece	60
TP53	Mutace	45
MDM2	Amplifikace	10
EGFR	Amplifikace	40-50
PDGFRA	Amplifikace	65
IDH1	Mutace	70-80
C-myc	Amplifikace	
N-myc	Amplifikace	
CDK4	Amplifikace	50
Chromozom 22q	Delece	

**Tab. 12:** Nejčastější genové aberace nalézané u GBM

## 2 CÍLE PRÁCE

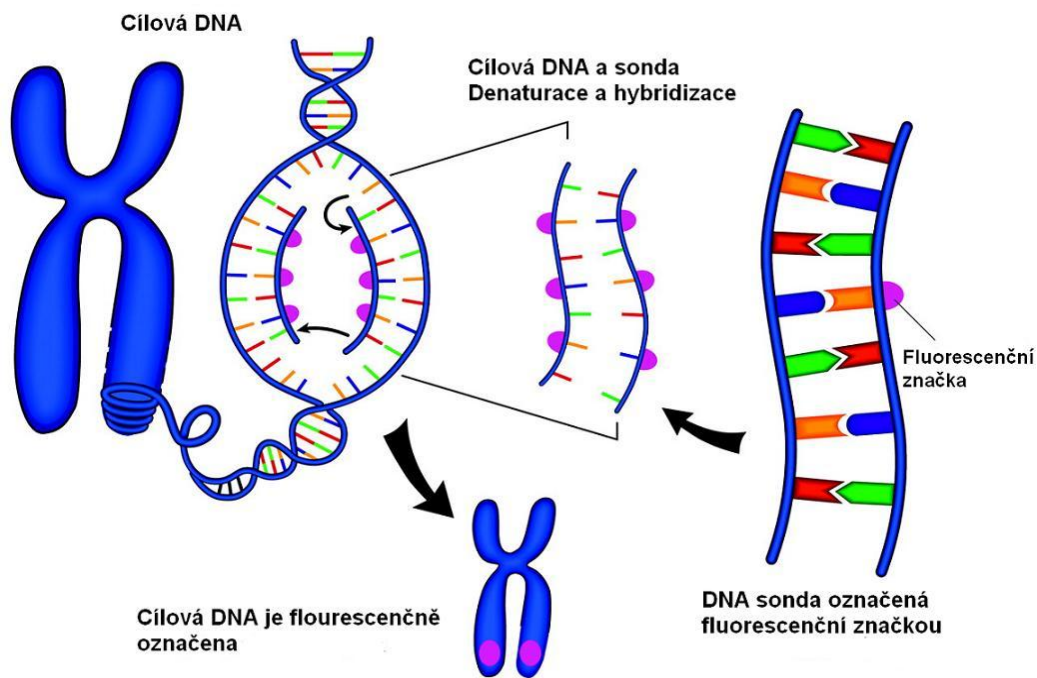
Cílem teoretické části diplomové práce bylo přehledně zpracovat problematiku nádorů centrální nervové soustavy s důrazem na glioblastom multiforme a molekulární mechanismy podílející se na vzniku a vývoji těchto nádorů. Hlavní pozornost byla zaměřena na možnosti využití cytogenetických aberací jako prediktivních a/nebo prognostických markerů.

Cílem praktické části diplomové práce bylo vyšetřit cytogenetické změny u pacientů s glioblastomem multiforme, metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Pro tento účel byly připraveny fluorescenčně přímo značené lokusově specifické DNA sondy pro geny C-myc, N-myc, cyklin D1 a BCR a centromerické sondy pro chromozomy 8 a 11. Tyto sondy byly zařazeny do sestavy sond (LSI 1p36.3, LSI 9p21.3, LSI 19q13, LSI TP53, LSI EGFR, LSI RB1, LSI MDM2 a CEP 7, CEP10 a CEP 13), používaných pro rutinní vyšetření vzorků pacientů s mozkovým nádorem pomocí metody FISH. Smyslem bylo ověřit význam nalezených aberací pro prognózu onemocnění, či predikci léčby.

### 3 MATERIÁL A METODIKA

Jednou z nejpoužívanějších cytogenetických vyšetřovacích metod je metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

Podstatou metody je hybridizace - navázání značené sondy k chromozomální DNA vyšetřovaného vzorku pacienta. DNA ve vyšetřovaném vzorku je nejprve působením teploty a specifických pufrů denaturována, tj. dojde k přerušení vodíkových můstků mezi jednotlivými vlákny a tím i k oddělení obou vláken od sebe. Tato denaturace je reverzibilní a po změně podmínek (odstranění příčin denaturace) dochází k opětovnému spojení (hybridizaci) komplementárních řetězců a znovu vytvoření dvojšroubovice DNA. Je-li v průběhu tohoto opětovného spojení přítomna sonda, dojde k jejímu navázání (hybridizaci) na komplementární sekvenci na vlákně DNA. K obdobné hybridizaci dochází mezi jednořetězcovými molekulami DNA/DNA, RNA/RNA, DNA/RNA, což umožňuje detekci specifických nukleotidových sekvencí pomocí nejen DNA, ale i RNA sond. Jako sonda (próba) je označována krátká jednořetězcová DNA (resp. RNA), obsahující takovou sekvenci nukleotidů, jakou chceme ve vyšetřovaném vzorku detekovat (část genu, chromozomu, telomerickou či centromerickou sekvenci apod.). Sonda je označena značkou, kterou lze různým způsobem detekovat. V případě FISH jsou sondy značeny nukleotidy, nesoucími fluorescenční barvivo, například SpectrumGreen nebo SpectrumOrange (Obr. 12). Výsledná fluorescence je detekována ve fluorescenčním mikroskopu (Alberts *et al.*, 1998; Kočárek *et al.*, 2006).



**Obr. 12:** Fluorescenční *in situ* hybridizace  
(Upraveno podle Wippold *et Perry*, 2007)

Metodu FISH lze použít k odhalení chromozomálních aberací, jako jsou delece, duplikace, translokace, amplifikace a další cytogenetické změny (Alberts *et al.*, 1998).

Při *in situ* hybridizaci (ISH) se používají především 4 typy sond:

- Oligonukleotidová sonda - obvyklá délka 40-50bp, vyráběny automatickou chemickou syntézou. Jsou ideální pro ISH, protože malá velikost umožňuje snadnou penetraci do buněk a tkání.
- Jednovláknová DNA sonda - obvyklá délka 200-500bp. Mají podobné výhody jako oligonukleotidové sondy. Mohou být produkovány reverzní transkripcí RNA nebo PCR použitím jednoho primeru. Nevýhodou je dlouhý čas přípravy a drahé reagensie používané k přípravě.
- Dvouvláknová DNA sonda – sekvence může být vložena do bakteriálního plazmidu, namnožena a izolována, nebo může být produkována pomocí PCR. Výhodou bakteriální produkce je možnost získat sondu ve velkém množství. Nevýhodou této sondy je větší tendence k rehybridizaci a tím menší citlivost.
- RNA sonda - je výhodná při hybridizaci RNA/RNA. Tento komplex je velmi termostabilní a rezistentní k RNázám. To umožňuje odstranění nenasazené sondy

po hybridizaci a redukci nespecifického pozadí. Přípravují se pomocí RNA polymerázou katalyzované transkripce nebo transkripcí in vitro lineární plazmidové DNA s RNA polymerázou (www.genedetect.com, 2011).

Podle místa hybridizace rozeznáváme:

- Alfa satelitní sondy, které hybridizují se specifickými chromozomovými sekvencemi. Obvykle se jedná o centromerické oblasti (označované CEP, Centromeric Enumeration Probes), či telomerické oblasti chromozomů.
- Lokusově specifické sondy, které hybridizují s jedinečnými sekvencemi DNA. Jsou označované jako tzv. LSI (Locus Specific Identifier). Používají se k detekci specifických sekvencí – genů či částí chromozomů.
- Celochromozomové (malovací) sondy, které hybridizují s mnohočetnými chromozomovými sekvencemi. Označují se WCP (Whole Chromosome Painting) a lze s nimi označit celý chromozom, jeho rameno či část ramene (Kočárek *et al.*, 2006).

V našem projektu jsme připravili vlastní sondy (LSI C-myc kombinovanou s CEP 8, LSI N-myc, LSI CCND1 kombinovanou s CEP 11 a LSI BCR).

### **3.1 Použitý materiál**

#### **3.1.1 Chemikálie, přístrojové vybavení, software**

Agar (Sigma, St.Louis, USA), agaróza (Sigma, St.Louis, USA), kvasničný extrakt (Sigma, St.Louis, USA), proteasový pepton (Sigma, St.Louis, USA), chloramfenikol (Sigma, St.Louis, USA), ampicilin (Sigma, St.Louis, USA), kanamycin (Sigma, St.Louis, Missouri, USA), kit pro purifikaci plazmidů - QIAfilter Plasmid Mega kit (Qiagen, Hilden, Německo), kit pro značení plazmidů Bioprime ArrayCGH Genome Labeling Module (Invitrogen), EDTA (Sigma, St.Louis, USA), Tris-HCl (Sigma, St.Louis, USA), kyselina octová, ethidium bromid (Sigma, St.Louis, USA), marker molekulové hmotnosti X (směs fragmentů DNA o definované velikosti 0,07-12,2 kbp) (Roche), dUTP SpectrumGreen a SpectrumOrange (Vysis, Downers Grove, USA), Cot1 DNA (Vysis, Downers Grove, USA), formamid (Sigma, St.Louis, USA), Salmon-sperm DNA (Sigma, St.Louis, USA),

dextran sulfát (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Velká Británie), pepsin (Sigma Aldrich), thiokyanát sodný (Sigma Aldrich), citrát sodný dihydrát (Sigma Aldrich), nonidet NP-40 (Sigma Aldrich), NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, formaldehyd, xylen, 96% ethanol, isopropanol, HCl a NaOH na úpravu pH roztoků, 20xSSC (Vysis), metanol, NaCl, purifikovaná voda (deionizovaná či destilovaná), lepidlo (rubber cement), hybridizační pufr (Abbott Molecular), DAPI II (4,6-diamidino-2-fenylindol; Abbott Molecular), imerzní olej (Olympus).

Použité kolony a pufrы P1 (Tris-Cl, EDTA, RNáza), P2 (NaOH, SDS), P3 (octan sodný), QBT (NaCl, MOPS, izopropanol, triton X-100), QC (NaCl, MOPS, izopropanol) a QF (NaCl, Tris-Cl) jsou součástí kitu pro izolaci a purifikaci plazmidů (QIAfilter Plasmid Mega kit).

Běžné laboratorní sklo, kyvety, mikropipety, špičky, ependorfky nebo mikrocentrifugační zkumavky, podložní a krycí skla, bakteriologická klička, temperovaná třepačka, Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), analytické váhy, mikrovlnná trouba, sada pro elektroforézu (Biorad), UV transluminátor, vortex, termostat, výhřevná plotýnka (termoblok), vodní lázeň, pH metr, mikrocentrifuga, vlhká komůrka, HYBrite Denaturation/Hybridization System for FISH (Vysis, Downers Grove, USA), mikroskop Olympus BX60 se snímací kamerou (Olympus, Tokio, Japonsko), software pro snímání a analýzu obrazu ISIS (MetaSystems, Altlussheim, Německo).

### 3.1.2 Použité roztoky

TE pufr	(10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH=8,0)
10x PBS	(1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,3)
WB pufr	(2x SSC; pH 7,0)
20x SSC	(3 M NaCl; 0,3 M citrát sodný-dihydrát; pH 5,3)
10 % formalin	(4% formaldehyd v 10x PBS)
WSI	(0,4x SSC; 0,3% NP-40; pH 7,5)
WSII	(2x SSC; 0,1% NP-40; pH 7,0)

## **3.2 *Nádorové vzorky a charakteristiky pacientů***

Pro experimenty byl ve spolupráci s Neurochirurgickou klinikou FN Olomouc poskytnut soubor pacientů s diagnostikovaným glioblastomem (grade IV, glioblastoma multiforme).

## **3.3 *Použité metody***

### **3.3.1 *Příprava sondy***

#### **3.3.1.1 *Kultivace a izolace plazmidové DNA***

Bakteriální kmeny nesoucí plazmidy s požadovanou sekvencí sondy byly získány od prof. M. Rocchiho, Dipartimento Genetica e Microbiologia, Università di Bari, Itálie. Veškeré experimenty s těmito klony podléhaly evidenci a pravidlům práce dle Povolení pro práci s geneticky modifikovanými organismy, udělené Laboratoři experimentální medicíny ministerstvem životního prostředí ČR. Klony byly dodány v agaróзовé půdě. Bakterie byly nejprve kultivovány ve sterilním LB médiu (37 °C, 4-6 hodin) a následně selektovány na agarových plotnách, obsahujících ampicilin, chloramfenikol nebo kanamycin. Vyselektované subklony byly zamrazeny v 10% glycerolu v PBS při -80 °C nebo použity pro izolaci DNA.

Před izolací byly nejprve bakterie kultivovány v LB médiu na třepačce při 37 °C a získaná bakteriální peleta byla použita pro izolaci plazmidu. Plazmidová DNA byla izolována pomocí QIAfilter Plasmid Mega kitu. Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop a její integrita byla ověřena pomocí agaróзовé elektroforéze v 1% gelu.

#### **3.3.1.2 *Značení random prime***

Plazmidová DNA byla značena pomocí kitu Bioprime ArrayCGH Genome Labeling Module. Ke značení bylo bráno 500 µg plazmidové DNA v celkovém objemu 21 µl (chybějící objem byl doplněn sterilní vodou). K plazmidové DNA bylo přidáno 20 µl 2,5x koncentrované směsi random primerů (kit). Směs byla vortexována, centrifugována a denaturována ve vodní lázni (96 °C, 10 min). Poté byla směs rychle ochlazená na ledu (2

min) a centrifugována. Bylo přidáno 5  $\mu$ l mixu dNTP (kit), 1,5  $\mu$ l dUTP-SpectrumGreen/SpectrumOrange. Poté bylo přidáno 1  $\mu$ l Exo Klenowova fragmentu (kit), směs byla jemně promíchána a inkubována přes noc (37°C).

Ke směsi bylo přidáno 50  $\mu$ l TE pufru, 400  $\mu$ l purifikačního pufru A a byla přenesena na kolonu (součást kitu), kde došlo k zachycení DNA. Eluát byl odstraněn centrifugací (13 000 g/1 min) a DNA v koloně přečištěna 600  $\mu$ l purifikačního pufru B (centrifugace 13 000 g/1 min). Kolona se zachycenou DNA byla opět centrifugována (13 000 g/1 min) pro úplné odstranění pufru B. DNA byla následně rozpuštěna v 50  $\mu$ l vody (kit).

K 50  $\mu$ l značené DNA bylo přidáno 25  $\mu$ l Cot 1 DNA a DNA byla vysrážena přidáním 7,5  $\mu$ l octanu sodného a 206  $\mu$ l 96% ethanolu. Směs byla jemně promíchána a uložena do mrazu při -70°C na 20 min. Poté byla centrifugována (13 000 g/15 min/4°C). Supernatant byl slit a peleta usušena volně na vzduchu. Peleta byla rozpuštěna v 50  $\mu$ l hybridizačního pufru (37°C, 10 min). Takto připravená sonda byla použita pro metodu FISH. Před použitím v experimentech byla připravená sonda ověřena na preparátech s interfázními jádry i na chromozomálních preparátech. Byl prověřen vazebný úsek sondy na chromozomu a zároveň byla kvalita připravené sondy otestována na vybraných buněčných liniích a parafinových řezech.

### **3.3.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace**

Před vlastní metodou FISH byly nejprve vzorky, tkáňové řezy fixované na podložním skle, deparafinizovány a opracovány pro použití FISH (pretreatment). Preparáty byly nejprve inkubovány 3x v xylenu, po 10 minutách. Následovalo odmytí xylenu v 96% ethanolu (2x 5 min). Preparáty byly vysušeny na vyhřáté plotně (45-50 °C, 3-4 min). Tkáň preparátů byla natrávena pomocí HCl (20 min), promyta deionizovanou vodou (3 min) a v oplachovacím WB pufru (3 min). Poté byly vzorky inkubovány ve NaSCN (80 °C, 20 min), čímž došlo k redukci nespecifického fluorescenčního pozadí. Následovalo promytí deionizovanou vodou (1 min) a WB pufrem (2x 5 min). Poté byly vzorky natráveny proteolytickým enzymem pepsinem v roztoku NaCl (pH 2, 36 °C, 20 min). Následně byly preparáty promyty ve WB pufru (2x 5 min) a vysušeny na vyhříváné plotně. Následovala fixace vzorků v 10% roztoku formalínu (10 min), promytí WB pufrem (2x 5 min) a usušení na vyhříváné plotně. Na takto připravené tkáň bylo nanášeno asi 1,5  $\mu$ l příslušné sondy a preparát byl přikryt krycím sklíčkem. Jako prevence vysychání preparátu byla krycí sklíčka zalepena lepidlem (rubber cement). Takto připravené preparáty byly vloženy do



hybridizéru, kde došlo nejprve k denaturaci DNA (85 °C, 1 min) a poté k následné hybridizaci sondy (37 °C, přes noc) ke komplementárním místům na DNA. Druhý den byly nenávané sondy odmyty pomocí promývacího pufru WSI (83 °C, 1:45 min) a WSII (laboratorní teplota, 30 min). Po vysušení na vzduchu, bez přístupu světla byla tkáň imobilizována za pomoci montážního média, které obsahovalo fluorescenční barvivo DAPI, které slouží k vizualizaci chromatinu. Hodnocení signálů bylo provedeno ve fluorescenčním mikroskopu, s pomocí příslušného filtru. U každého preparátu bylo odečteno 100 jader, ze kterých byl vypočítán průměrný počet kopií signálu na jádro.

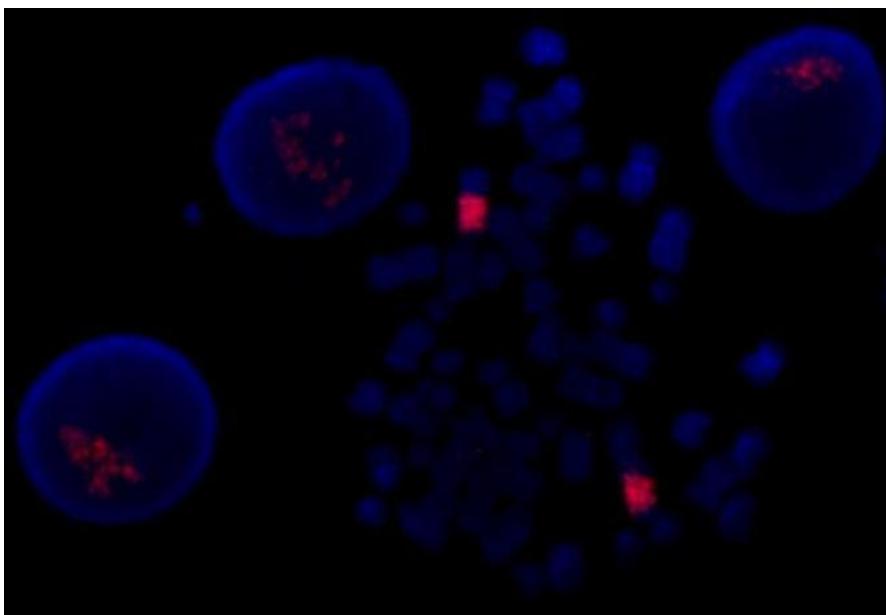
### **3.3.3 Metoda reFISH**

Problémem u nádorů mozku je obtížné získávání vzorků. Proto se jako řešení nabízí opakované použití tkáně pro metodu FISH. Při tomto postupu, tzv. reFISH je nejprve odmyta sonda předchozí a následně nanášena sonda nová. Kvalita mikroskopického obrazu je sice horší, nicméně stále stačí ke spolehlivému odečtení výsledků.

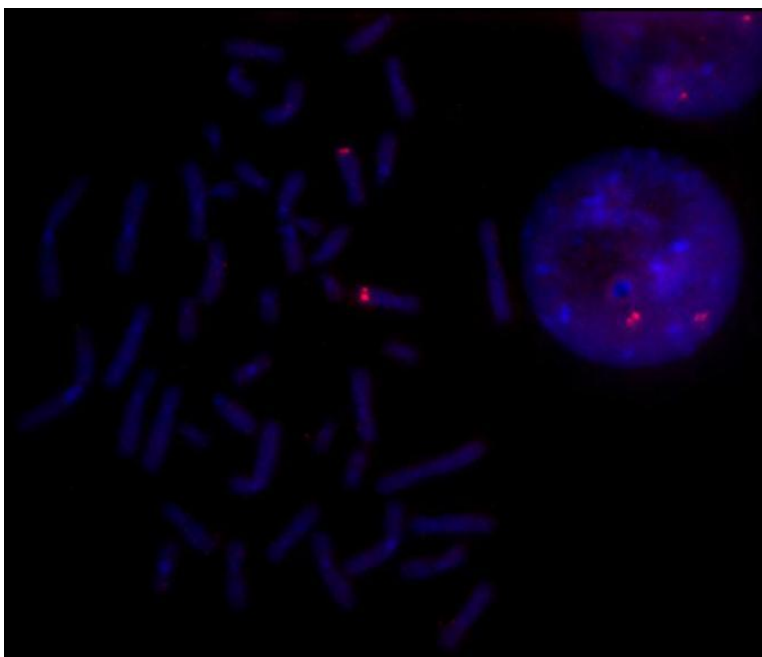
Při tomto postupu byla mikroskopická skla s preparáty nejprve inkubována v ethanolu s krycími sklíčky a poté bez nich (oboje po 2 min) (k odstranění imerzního oleje, použitého při odečtu preparátů). K odmytí sondy byla použita směs formamidu (24,5 µl), vody (7 ml) a 20x SSC (3,5 ml) po dobu 5 min při 73 °C. Poté byly preparáty dehydratovány vzestupnou etanolovou řadou (75%, 80%, 96%), každá po dobu 1 min. Vzorky byly vysušeny na vyhřívané plotně. Na každý vzorek bylo nanášeno asi 1,5 µl sondy, přiklopeny krycím sklíčkem a zakryty lepidlem (rubber cement). Poté byly vzorky vloženy do hybridizéru, kde sondy hybridizovaly přes noc. Druhý den ráno byly nenávané sondy odmyty pomocí WSI a WSII pufru (viz 3.3.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace). Takto připravené preparáty byly pozorovány a hodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu za použití příslušného filtru.

## 4 VÝSLEDKY

Metodou Random primer labeling byly v praktické části diplomové práce připraveny lokusově specifické sondy pro geny C-myc, N-myc, cyklin D1 a BCR, fluorescenčně přímo značené barvou SpektrumOrange a centromerické sondy pro chromozomy 8 a 11 značené fluorescenční barvou SpectrumGreen. U všech sond byla ověřena jejich specifita na volných chromozomech a v buněčných jádrech (Obr. 13, Obr. 14).



**Obr. 13:** Ověření specifity sondy LSI C-myc na chromozomálním preparátu (buněčná linie HL-60 – akutní promyelocytární leukemie). Na fotografii je zachycena amplifikace genu C-myc, jak u interfázních jader, tak na chromozomu 8. Amplifikace byla detekována s vysokou specifitou pouze v příslušné oblasti chromozomu 8 (LEM, snímací software MetaSystems).



**Obr. 14:** Ověření specifity sondy LSI C-myc na chromozomálním preparátu (fyziologický vzorek). Na fotografii lze pozorovat fyziologický počet signálů pro gen C-myc, lokalizovaný v příslušné oblasti chromozomu 8. Hybridizace v jiných oblastech chromozomu 8 či na jiných chromozomech (crosshybridizace) nebyla nalezena (LEM, snímací software MetaSystems).

Připravené sondy se jeví jako vysoce specifické, signály z jiných oblastí chromozomů nejsou přítomny. Sondy rovněž vykazují dobrou schopnost pronikat do parafinových tkáňových řezů, které vzhledem k nutnosti úpravy vzorku před samotnou FISH (dehydratace tkáně, digesce mezibuněčné hmoty) představují obtížně vyšetřovatelný materiál.

Sondy připravené v tomto projektu byly zařazeny do sestavy rutinně používaných sond, používaných v Laboratoři experimentální medicíny pro vyšetření vzorků pacientů s nádorem mozku (přidány k souboru sond pro detekci cytogenetických změn v chromozomálních oblastech 1p36.3, 9p21.3, 19q13, změn v počtech kopií genů p53, EGFR, RB1, MDM2 a počtech chromozómů 7, 10 a 13).

Pro tuto práci byla z celkového souboru pacientů s nádorem CNS vybrána skupina 100 pacientů s diagnózou glioblastom (grade IV, glioblastoma multiforme), kteří prodělali první operaci v letech 2005-2010. V tomto souboru bylo zahrnuto 54 (54%) mužů a 46

(46%) žen. Průměrný věk při první operaci byl 62 let a medián věku při první operaci byl 61 let. Nejmladšímu pacientovi bylo v době operace 30 let, nejstaršímu 85 let. Medián přežití pacientů jsou 4 měsíce. Maximální přežití dosáhlo 37 měsíců, 34% pacientů dosud žije. Podle lokalizace se glioblastomy nacházely nejvíce v parietálním laloku (28%), frontálním (24%), temporálním (23%) a okcipitálním (14%). 5% nádorů bylo umístěno v jiných částech mozku a 6% případů nemělo určenou přesnou lokalizaci. Metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) byl tento soubor pacientů vyšetřen pomocí lokusově specifických a centromerických sond. Vzorky byly hodnoceny pod příslušným filtrem ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX60 a u každého vzorku bylo odečteno 100 nepřekrývajících se jader. Byly hodnoceny změny v počtu kopií genů, oblastí a chromozomů, případně byl vypočítán poměr gen/chromozom, na kterém je gen lokalizován.

Cytogenetické abnormality (amplifikace nebo delece) byly hodnoceny dvěma způsoby. Za amplifikací/deleci genu byly považovány případy, u kterých se příslušná aberace nacházela ve vyšetřovaném řezu u minimálně 20% jader. Při druhém způsobu byl vypočítán průměrný počet signálů pro jednotlivé geny, chromozomální oblasti a chromozomy, resp. poměry gen/chromozom. Jako hranice pro zmnožení (amplifikaci) byl brán průměrný počet kopií v buňce  $\geq 2,5$  a/nebo průměrná hodnota poměru gen/chromozom  $\geq 2,0$ . Naopak, za deletovaný byl pokládán gen s průměrným počtem kopií v jádře  $\leq 1,8$  a/nebo poměrem gen/chromozom  $\leq 0,8$ .

Přehled jednotlivých aberací (aberrace přítomna ve  $\geq 20$  % vzorku) je uveden v Tab. 15.

Gen/chromozom/oblast	Amplifikace [%]	Delece [%]
Chromozom 8	27 (4/15)	0
Gen C-myc	47 (7/15)	0
Poměr C-myc/chrom. 8	0	0
Gen N-myc	14 (8/59)	5 (3/59)
Gen BCR	52 (12/23)	26 (6/23)
Chromozom 7	23 (22/95)	0
Gen EGFR	62 (59/95)	0
Poměr EGFR/chrom. 7	42 (40/95)	0

Chromozom 11	12 (5/41)	2 (1/41)
Gen CCND1	24 (10/41)	2 (1/41)
Poměr CCND1/chrom. 11	0	0
Oblast 9p21.3	5 (5/96)	31 (30/96)
Oblast 1p36.3	6 (6/96)	22 (21/96)
Chromozom 13	9 (9/96)	5 (5/96)
Gen RB1	7 (7/96)	28 (27/96)
Poměr RB1/chrom. 13	0	9 (9/96)
Gen TP53	19 (18/96)	14 (13/96)
Chromozom 10	3 (3/96)	20 (19/96)
Oblast 19q13	20 (18/92)	17 (16/92)
Gen MDM2	20 (17/87)	0

**Tab. 15:** Přehled glioblastomů multiforme, nesoucích určitou cytogenetickou aberaci. Za amplifikovaný nebo deletovaný byl gen/oblast/chromozom označen při nálezu aberace ve více než 20% buněk.

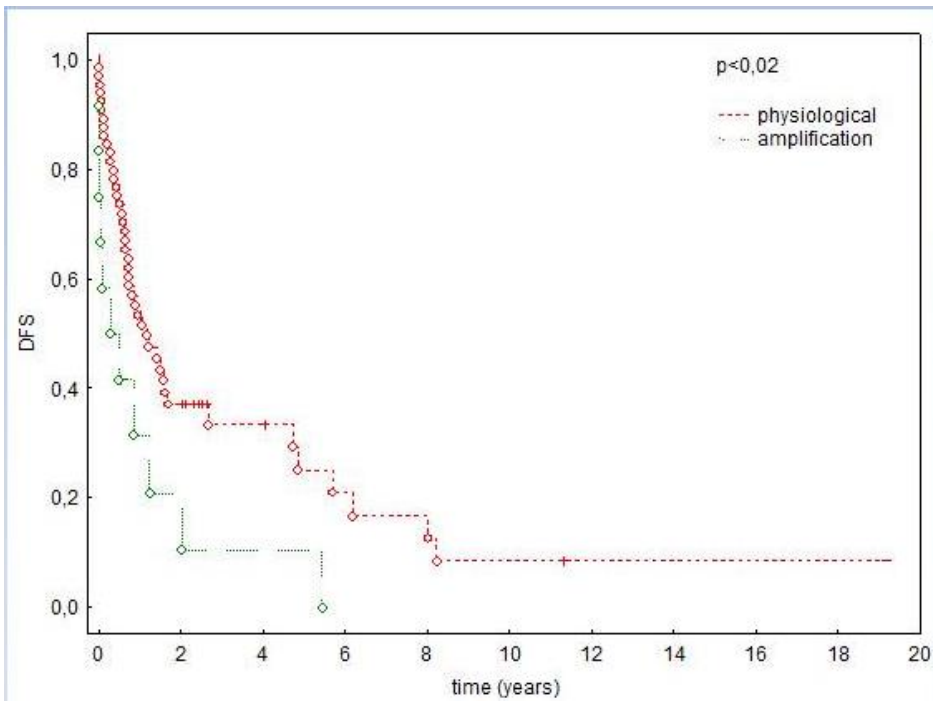
V Tab.16 je uveden přehled aberací v souboru, hodnocených dle průměru počtu kopií na jádro (resp. poměru gen/chromozom):

Gen/chromozom/oblast	Amplifikace [%]	Delece [%]
Chromozom 8	13 (2/15)	0
Gen C-myc	40 (6/15)	0
Poměr C-myc/chrom. 8	0	0
Gen N-myc	8 (5/59)	3 (2/59)
Gen BCR	35 (8/23)	13 (3/23)
Chromozom 7	12 (11/95)	0
Gen EGFR	60 (56/95)	0
Poměr EGFR/chrom. 7	36 (34/95)	0
Chromozom 11	5 (2/41)	2 (1/41)
Gen CCND1	15 (6/41)	2 (1/41)
Poměr CCND1/chrom. 11	0	0
Oblast 9p21.3	3 (3/96)	9 (9/96)

Oblast 1p36.3	5 (5/96)	5 (5/96)
Chromozom 13	4 (4/96)	2 (2/96)
Gen RB1	4 (4/96)	14 (13/96)
Poměr RB1/chrom. 13	0	2 (2/96)
Gen TP53	16 (15/96)	4 (4/96)
Chromozom 10	1 (1/96)	9 (9/96)
Oblast 19q13	15 (14/92)	2 (2/92)
Gen MDM2	18 (16/87)	0

**Tab. 16:** Procento glioblastomů multiforme nesoucích určitou cytogenetickou aberaci. Za amplifikovaný nebo deletovaný je gen/oblast/chromozom označen při překročení hraničních hodnot průměrného počtu kopií signálu v jádře, případně poměru genu a příslušného chromozomu.

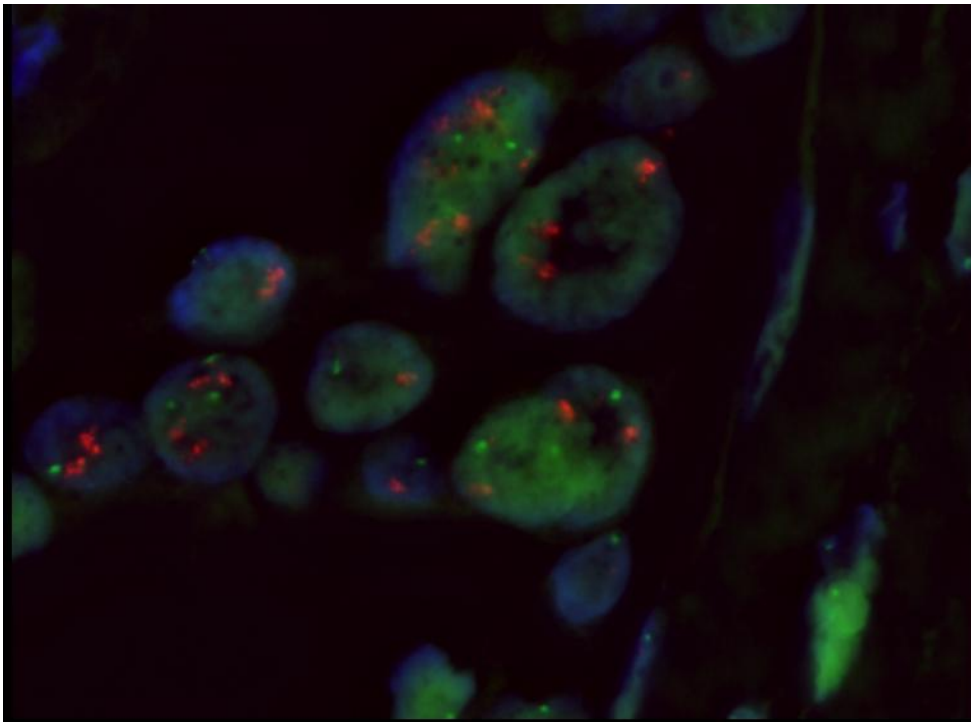
U souboru pacientů byl rovněž sledován medián přežití. Ke kvalitnímu vyhodnocení tohoto parametru však soubor dosud neobsahuje dostatek pacientů (viz dále). V další práci bude soubor rozšířen o další pacienty, následně budou naše i další prospektivní výsledky korelovány i s dalšími klinicko-laboratorními parametry. Cílem bude potvrdit význam nalezených aberací pro zpřesnění diagnostiky, prognózu onemocnění či predikci léčby. Předběžné statistické výpočty naznačují, že některé ze zavedených stanovovaných markerů by mohly mít význam především na délku přežití pacientů. Například na Obr. 17 lze zřetelně sledovat rozdíl v přežití bez nemoci (DFS) u pacientů s amplifikací a normálním statutem genu MDM2, jedná se však pouze o trend, korelace dosud nebyla prokázána ( $p < 0,02$ ).



**Obr. 17:** Závislost DFS na statusu genu MDM2 u pacientů s glioblastoma multiforme.

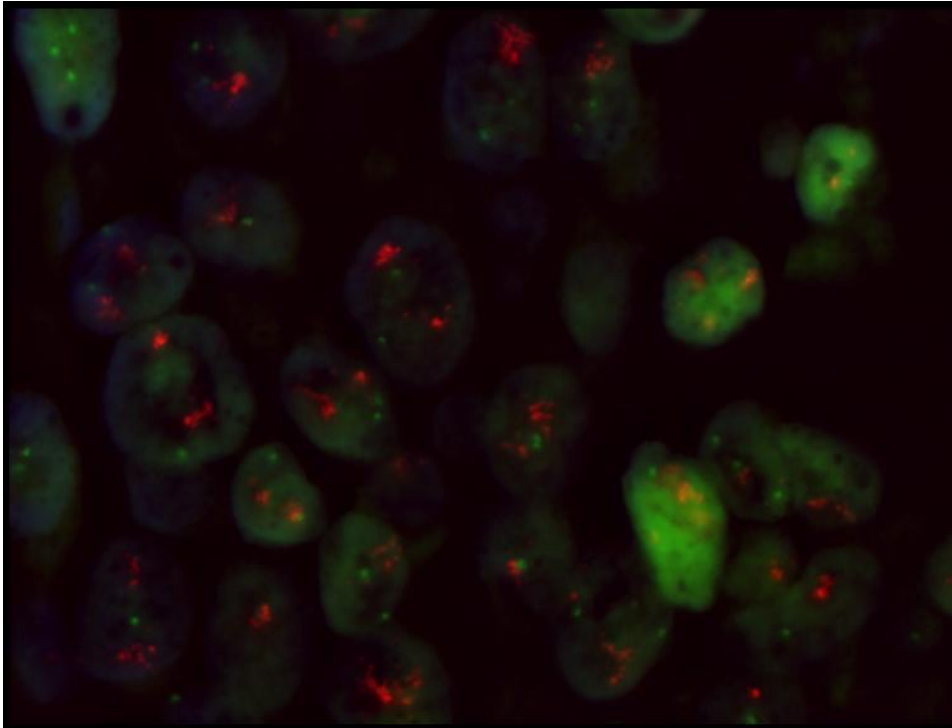
## 5 DISKUZE

V praktické části diplomové práce byly připraveny lokusově specifické sondy pro geny C-myc, N-myc, CCND1 a BCR, fluorescenčně přímo značené barvou SpektrumOrange a centromerické sondy pro chromozomy 8 a 11 značené fluorescenční barvou SpectrumGreen. Tyto sondy byly připraveny metodou značení pomocí náhodných primerů (Random primer labeling). Připravené sondy vykazovaly specifitu a dobrou schopnost pronikat do tkáňových řezů, obtížně vyšetřovatelného materiálu. V porovnání signálů sondy připravené v laboratoři (Obr. 18) a komerční sondy (Obr. 19) byly signály připravené sondy plně srovnatelné.



**Obr. 18:** Hybridizace se sondou pro gen C-myc a chromozom 8 na parafinovém řezu gliomu. Sonda připravená v laboratoři (LEM, snímací software MetaSystems).





**Obr. 19:** Hybridizace se sondou pro gen C-myc a chromozom 8 na parafinovém řezu gliomu. Sonda komerční (LEM, snímací software MetaSystems).

Metodou FISH s použitím fluorescenčně přímo značených sond byl u pacientů s GBM v rámci rutinního vyšetřování stanoven status chromozomálních oblastí 1p36.3, 9p21.3, 19q13, genů p53, EGFR, RB1, MDM2 a chromozomů 7, 10 a 13. Následně byly vzorky vyšetřeny námi připravenými sondami, k detekci genů C-myc, N-myc, CCND1, BCR a počtu kopií chromozomů 8 a 11. Tyto geny byly pro práci zvoleny z důvodu, že jejich význam u jiných onkologických diagnóz byl již prokázán a lze u nich přepokládat prediktivně-prognostický význam i u GBM.

Gen C-myc je amplifikován a overexprimován u řady nádorových onemocnění, k nimž patří například karcinom prostaty (Jenkins *et al.*, 1997), prsu (Chrzan *et al.*, 2001), plic (Mitani *et al.*, 2001), tlustého střeva (Yang *et al.*, 1996). Dále je C-myc amplifikovaný nebo overexprimovaný v glioblastomech a meningeomech (Chung *et Seizinger*, 1992). Procentuální zastoupení amplifikace genu C-myc u glioblastoma multiforme není v literatuře udáno. V našem souboru byla nalezena amplifikace u 47% případů GBM. Např. u nádorů prsu a melanomu je amplifikace považována za negativní prognostický faktor spojený se špatnou prognózou a kratší celkovou dobou přežití (Berns *et al.*, 1992;

Grover *et al.*, 1997). U gliomů byla popsána především zvýšená exprese C-myc, a to až u 84% případů GBM (Herms *et al.*, 1999) U gliomů koreluje exprese C-myc i s gradem onemocnění. Nízká exprese je nalézána u gradu I a II, naopak u gradu III a IV je exprese vysoká (Herms *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2008). U našeho souboru byl u pacientů s amplifikací C-myc pozorován nízký medián přežití, avšak data nejsou dosud statisticky významná, především z důvodů malého souboru pacientů.

Amplifikace genu N-myc byla popsána u nádoru štítné žlázy (Boulwood *et al.*, 1988; Roncalli *et al.*, 1994), retinoblastomu (Doz *et al.*, 1996), rhabdomyosarkomu (Driman *et al.*, 1994) a nádoru prsu (Mizukami *et al.*, 1995). N-myc je amplifikován nebo overexprimován i v mozkových nádorech, meduloblastomech, astrocytomech, meningeomech a především v neuroblastomech, pro které je amplifikace N-myc typická (asi ve 40%) a je významně spojená s pokročilým stupněm nádoru (Bagatell *et al.*, 2009; Brodeur *et al.*, 1984; Venter *et al.*, 1991) a rychlou progresí, nezávislou na věku a stupni tumoru (Seeger *et al.*, 1985). Overexprese byla popsána v 57% GBM (Herms *et al.*, 1999). N-myc je považován za prediktivní parametr přežití bez progresu a jeho amplifikace je spojena s horší prognózou u neuroblastomů (Brodeur *et al.*, 1984; Tsuda *et al.*, 1987). U našeho souboru byl gen N-myc amplifikován u 14% případů GBM.

Overexprese a amplifikace cyklinu D1 je přítomna v různých typech nádorů, například u lymfomu plášťových buněk (mantle cell lymphoma) (Jares *et al.*, 2007), nádoru plic (Jin *et al.*, 2001), karcinomu prsu (Barnes *et al.*, 1998; Buckley *et al.*, 1993; Gillett *et al.*, 1994), hlavy a krku (Izzo *et al.*, 1998), hypofýzy (Hibberts *et al.*, 1999). Zvýšená exprese byla nalezena u 56-62% high-grade gliomů (Cavalla *et al.*, 1998; Chakrabarty *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2005). Exprese cyklinu D1 se zvyšuje se zvyšujícím se gradem gliomu (Cavalla *et al.*, 1998; Chakrabarty *et al.*, 1996). Overexprese cyklinu D1 je spojena se špatnou prognózou u nádorů močového měchýře (Shin *et al.*, 1997), u karcinomů prsu (Hall *et al.*, 1996; Michalides, 1998), u karcinomů hlavy a krku a jícnu (Ishikawa *et al.*, 1998; Meredith *et al.*, 1995; Michalides *et al.*, 1997) a i u gliomů (Cavalla *et al.*, 1998; Chakrabarty *et al.*, 1996). V našem souboru byla amplifikace CCND1 nalezena u 24% případů.

Sonda pro gen BCR byla zařazena do sestavy sond pro vyšetřování cytogenetických změn u GBM pro zjišťování počtu kopií chromozomální oblasti 22q. Delece 22q je popisována u primárních nádorů mozku, například u meningeomů (40-70%) (Akagi *et al.*, 1995;

Chang *et al.*, 2010), a je nejčastější změnou u ependymomů (přítomná ve 30% případů) (Huang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2009). Je popisována také u glioblastomů (Kanu *et al.*, 2009). Ztráta chromozomální oblasti 22q je detekována v přibližně 23-38% GBM (Ino *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2009). LOH 22q je častá v gliomech vysokého gradu, a v gliomech nízkého gradu se vyskytuje ojediněle (Nakamura *et al.*, 2005). U našeho souboru byla nalezena delece genu BCR/oblasti 22q u 26% vzorků, avšak překvapivě u většího počtu pacientů (52%) byl nalezen vyšší počet kopií (amplifikace). Tento jev není v literatuře příliš popisován, a proto u těchto pacientů plánujeme provést verifikaci vyšetření jinou (například komerční) sondou, abychom vyloučili možnost případné zkřížené hybridizace připravené sondy.

Nejčastější aberací, která byla u našeho souboru nalezena, byla amplifikace genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), a to u 62% případů. Ačkoliv je gen pro receptor epidermálního růstového faktoru amplifikován především u epidermálních nádorů, jeho amplifikace bývá nalézána i u nádorů CNS. V literatuře je amplifikace EGFR popisována asi u 40 - 60% GBM, což koresponduje s našimi výsledky (Hui *et al.*, 2001; Shinojima *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 1987). Je pravděpodobné, že amplifikovaný EGFR podporuje invazivitu a migraci gliomových buněk (Kim *et al.*, 2008; Lund-Johansen *et al.*, 1990). Zvýšené exprese EGFR se připisuje korelace s vyšším stádiem onemocnění, zvýšenou agresivitou a zhoršeným přežíváním (Nesković-Konstantinović *et al.*, 1999; Sauter *et al.*, 1996). Kratší přežití v závislosti na overexpresi EGFR je popisováno například u laryngeálního karcinomu (Maurizi *et al.*, 1996), karcinomu hlavy a krku (Ang *et al.*, 2002) nebo u karcinomu prsu (Klijn *et al.*, 1992). Amplifikace genu EGFR je považována za nepříznivý prognostický marker pro přežívání i u pacientů s GBM (Huncharek *et al.*, 2000; Muracciolo *et al.*, 2002). Některé studie považují status EGFR za ukazatel prognózy po prodělané radioterapii (Ang *et al.*, 2002; Giralt *et al.*, 2005), či mu připisují roli při predikci léčebné odpovědi na radioterapii (Barker *et al.*, 2001; Eriksen *et al.*, 2005). Na druhé existují studie, ve kterých prognostický vliv overexprese EGFR prokázán nebyl (Hirsch *et al.*, 2003; McKay *et al.*, 2002). Přítomnost amplifikace EGFR u GBM rovněž otevírá možnost léčby nízkomolekulárními inhibitory EGFR, které pronikají i encefalickou bariérou (např. erlotinib). Nicméně, jejich použití v terapii GBM nevykazuje očekávané výsledky (MUDr. O. Kalita, Neurochirurgická klinika FN Olomouc – osobní sdělení).

Další častou aberací nacházenou u našeho souboru pacientů byla delece chromozomální oblasti 9p21.3. Delece byla přítomna u 31% glioblastomů multiforme. Ztráta 9p byla popsána u 47-64% případů GBM (Houillier *et al.*, 2006; Nishizaki *et al.*, 1998). V této oblasti je lokalizován gen p16, jehož delece byla pozorována u 31-46% GBM (Ohgaki *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 1994). LOH 9p21 je popisována také u jiných nádorů, například nádorů vaječníků (Campbell *et al.*, 1995; Kamb *et al.*, 1994), u karcinomu prsu (Cairns *et al.*, 1995; Kamb *et al.*, 1994), močového měchýře a prostaty (Cairns *et al.*, 1995). Ztráta oblasti 9p je asociována s GBM, u gliomů nízkého gradu nebývá nalézána (Moulton *et al.*, 1995). Ztráta exprese p16 je pravděpodobně spojena s invazivitou a metastazováním (Reed *et al.*, 1995). Ztráta 9p je spojena se špatnou prognózou (Houillier *et al.*, 2006), stejně jako delece p16 (Kamiryo *et al.*, 2002). Podle některých studií, je LOH 9p je spojena s kratším přežitím pacientů s GBM (Rasheed *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2002; Terada *et al.*, 2002), ale je asociována s lepší prognózou při léčbě GBM temozolomidem (Wemmert *et al.*, 2005).

Amplifikace MDM2 byla poprvé nalezena u sarkomů kostí a měkkých tkání (Oliner *et al.*, 1992). V našem případě byla nalezena amplifikace u 20% případů, což koresponduje s literárními údaji. Hulleman *et Helin* (2005) uvádí, že amplifikace MDM2 je přítomna pouze u 10-15% glioblastomu, zatímco overexprese je pozorována až u 50% primárních glioblastomů (Ohgaki *et Kleihues*, 2005). Overexprese MDM2 je nalézána také u nádorů mozku, včetně glioblastomů nebo oligodendrogliálních nádorů (Kamiya *et Nakazato*, 2002) a ependymomů (Reifenberger *et al.*, 1993). Zvýšená exprese je pozorována v závislosti na histologickém gradu onemocnění (Ranuncolo *et al.*, 2004; Suzuki *et Iwaki*, 2000). Exprese MDM2 je indikátorem celkového přežití a přežití bez nemoci u pacientů s difuzním astrocytomem (Houillier *et al.*, 2006; Korkolopoulou *et al.*, 1997) a zvýšená exprese je spojena horší prognózou u pacientů s GBM (Houillier *et al.*, 2006; Schiebe *et al.*, 2000). Prognostická hodnota MDM2 ovšem zůstává kontroverzní, protože některé studie tuto korelaci nepotvrdily (Kamiya *et Nakazato*, 2002; Newcomb *et al.*, 1998; Stark *et al.*, 2003).

## 6 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce bylo vyšetřeno 100 vzorků pacientů s glioblastomem multiforme, jako součást velkého projektu s cílem detekce prediktivně - prognostických cytogenetických markerů. Metodou FISH byl u pacientů s GBM v rámci rutinního vyšetřování stanoven status chromozomálních oblastí 1p36.3, 9p21.3, 19q13, genů p53, EGFR, RB1, MDM2 a chromozomů 7, 10 a 13. Následně byl v rámci našeho projektu u tohoto souboru pacientů vyšetřen status genů C-myc, N-myc, cyklin D1 a BCR a počet chromozomů 8 a 11, pomocí připravených fluorescenčně přímo značených sond. Tyto sondy byly rovněž zařazeny do sestavy sond, rutinně používaných v Laboratoři experimentální medicíny pro vyšetření vzorků pacientů s mozkovým nádorem.

U pacientů s GBM byl nejčastěji aberovaným markrem gen pro receptor pro epidermální růstový faktor EGFR (amplifikován u 62% vzorků), dále gen C-myc (amplifikován u 47%). Amplifikace genu N-myc byla detekována u 14% vzorků a gen cyklin D1 byl amplifikovaný u 24% případů. Delece genu BCR/oblasti 22q byla nalezena u 26% vzorků. Zároveň byly sledovány i klinické parametry, například medián přežití, věk při první operaci a korelace mezi nimi a příslušnou cytogenetickou změnou. Ačkoliv se zdá, že sledované markery budou mít prognosticko-prediktivní význam, je potřeba jednotlivé trendy ověřit na větším množství pacientů. V současnosti probíhá prospektivní testování dalších patientských vzorků a zároveň je zvažován v rámci dalšího projektu dovyšetření i dalších cytogenetických markerů.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998): *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, Ústí nad Labem.

Akagi K., Kurahashi H., Arita N., Hayakawa T., Monden M., Mori T., Takai S., Nishisho I. (1995): Deletion mapping of the long arm of chromosome 22 in human meningiomas. *International Journal of Cancer* 60: 178-182.

Ambar B.B., Frei K., Malipiero U., Morelli A.E., Castro M.G., Lowenstein P.R., Fontana A. (1999): Treatment of experimental glioma by administration of adenoviral vectors expressing Fas ligand. *Human Gene Therapy* 10: 1641–1648.

Andrae J., Gallini R., Betsholtz C. (2008): Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development* 22: 1276–1312.

Ang K.K., Berkey B.A., Tu X., Zhang H.Z., Katz R., Hammond E.H., Fu K.K., Milas L. (2002): Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Research* 62: 7350-7356.

Bagatell R., Beck-Popovic M., London W.B., Zhang Y., Pearson A.D., Matthay K.K., Monclair T., Ambros P.F., Cohn S.L.; International Neuroblastoma Risk Group. (2009): Significance of MYCN amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database. *Journal of Clinical Oncology* 27: 365-370.

Balss J., Meyer J., Mueller W., Korshunov A., Hartmann C., von Deimling A. (2008): Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica* 116: 597–602.

Barker F.G., Simmons M.L., Chang S.M., Prados M.D., Larson D.A., Sneed P.K., Wara W.M., Berger M.S., Chen P., Israel M.A., Aldape K.D. (2001): EGFR overexpression and

radiation response in glioblastoma multiforme. *International Journal of Radiation Oncology \* Biology \* Physics* 51: 410-418.

Barnes D.M., Gillett C.E. (1998): Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 52: 1–15.

Benedetti S., Pirola B., Pollo B., Magrassi L., Bruzzone M.G., Rigamonti D., Galli R., Selleri S., Di Meco F., De Fraja C., Vescovi A., Cattaneo E., Finocchiaro G. (2000): Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nature Medicine* 6: 447–450.

Berns E.M., Foekens J.A., van Putten W.L., van Staveren I.L., Portengen H., de Koning W.C., Klijn J.G. (1992): Prognostic factors in human primary breast cancer: comparison of c-myc and HER2/neu amplification. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43: 13-19.

Blaheta R.A., Daher F.H., Michaelis M., Hasenberg C., Weich E.M., Jonas D., Kotchetkov R., Doerr H.W., Cinatl J. Jr. (2006): Chemoresistance induces enhanced adhesion and transendothelial penetration of neuroblastoma cells by down-regulating NCAM surface expression. *BMC Cancer* 6: 294.

Bleeker F.E., Lamba S., Leenstra S., Troost D., Hulsebos T., Vandertop W.P., Frattini M., Molinari F., Knowles M., Cerrato A., Rodolfo M., Scarpa A., Felicioni L., Buttitta F., Malatesta S., Marchetti A., Bardelli A. (2009): IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Human Mutation* 30: 7–11.

Bondy M.L., Scheurer M.E., Malmer B., Barnholtz-Sloan J.S., Davis F.G., Il'yasova D., Kruchko C., McCarthy B.J., Rajaraman P., Schwartzbaum J.A., Sadetzki S., Schlehofer B., Tihan T., Wiemels J.L., Wrensch M., Buffler P.A. (2008): Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 113: 1953-1968.

Boultonwood J., Wyllie F.S., Williams E.D., Wynford-Thomas D. (1988): N-myc expression in neoplasia of human thyroid C-cells. *Cancer Research* 48: 4073-4077.

Brodeur G.M., Seeger R.C., Schwab M., Varmus H.E., Bishop J.M. (1984): Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224: 1121-1124.

Buckley M.F., Sweeney K.J., Hamilton J.A., Sini R.L., Manning D.L., Nicholson R.I., deFazio A., Watts C.K., Musgrove E.A., Sutherland R.L. (1993): Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* 8: 2127–2133.

Bullock A.N., Fersht A.R. (2001): Rescuing the function of mutant p53. *Nature Reviews Cancer* 1: 68-76.

Burger P.C., Green S.B. (1985): Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 59: 1617-1625.

Cairns P., Polascik T.J., Eby Y., Tokino K., Califano J., Merlo A., Mao L., Herath J., Jenkins R., Westra W. (1995): Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nature Genetics* 11: 210-212.

Campbell I.G., Foulkes W.D., Beynon G., Davis M., Englefield P. (1995): LOH and mutation analysis of CDKN2 in primary human ovarian cancers. *International Journal of Cancer* 63: 222-225.

Cavalla P., Dutto A., Piva R., Richiardi P., Grosso R., Schiffer D. (1998): Cyclin D1 expression in gliomas. *Acta Neuropathologica* 95: 131-135.

CBTRUS (2010). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2006. Source: Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL. 60521. CBTRUS Web site: [www.cbtrus.org](http://www.cbtrus.org).

Cerman J., Němeček S., Náhlovský J. (2006): Onkogeneze a cytogenetická charakteristika gliomů. Sborník program, odborné přednášky. XIII. Postgraduální kurz v neurochirurgii, 5.4.-7.4. 2006, Hradec Králové. Vydala neurochirurgická klinika, FN, Hradec Králové. ISBN 80-239-6809-2.



Chakrabarty A., Bridges L.R., Gray S. (1996): Cyclin D1 in astrocytic tumours: an immunohistochemical study. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 22: 311-316.

Chan L.C., Karhi K.K., Rayter S.I., Heisterkamp N., Eridani S., Powles R., Lawler S.D., Groffen J., Foulkes J.G., Greaves M.F., Wiedemann L.M. (1987): A novel Abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 325: 635–637.

Chang I.B., Cho B.M., Moon S.M., Park S.H., Oh S.M., Cho S.J. (2010): Loss of heterozygosity at 1p, 7q, 17p, and 22q in meningiomas. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 48: 14–19.

Chrzan P., Skokowski J., Karmolinski A., Pawelczyk T. (2001): Amplification of c-myc gene and overexpression of c-Myc protein in breast cancer and adjacent non-neoplastic tissue. *Clinical Biochemistry* 34: 557-562.

Chung R.Y., Seizinger B.R. (1992): Molecular genetics of neurological tumours. *Journal of Medical Genetics* 29: 361-367.

Collins V.P. (1999): Progression as exemplified by human astrocytic tumors. *Seminars in Cancer Biology* 9: 267-276.

Collins V.P. (2004): Brain tumours: Classification and genes. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 75: ii2–ii11.

Croce C.M., Huebner K., Isobe M., Fainstain E., Lifshitz B., Shtivelman E., Canaani E. (1987): Mapping of four distinct BCR-related loci to chromosome region 22q11: order of BCR loci relative to chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia breakpoints. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 7174–7178.

Culver K.W., Ram Z., Wallbridge S., Ishii H., Oldfield E.H., Blaese R.M. (1992): In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550–1552.

Curtin J.F., King G.D., Candolfi M., Greeno R.B., Kroeger K.M., Lowenstein P.R., Castro M.G. (2005): Combining cytotoxic and immune-mediated gene therapy to treat brain tumors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 5: 1151-1170.

Dang Ch.V. (1999): c-Myc targeted genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism. *Molecular and cellular biology* 19: 1-11.

Doz F., Peter M., Schleiermacher G., Vielh P., Validire P., Putterman M., Blanquet V., Desjardins L., Dufier J.L., Zucker J.M., Mosseri V., Thomas G., Magdelénat H., Delattre O. (1996): N-MYC amplification, loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 1 and DNA ploidy in retinoblastoma. *European Journal of Cancer* 32: 645-649.

Driman D., Thorner P.S., Greenberg M.L., Chilton-MacNeill S., Squire J. (1994): MYCN gene amplification in rhabdomyosarcoma. *Cancer* 73: 2231-2237.

Dvořák K. (2010): Mozkové nádory. Celý text dostupný na [https://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl\\_cz/main+cnspatol+tumcns.html](https://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+cnspatol+tumcns.html) [5.11.2010].

Dylevský I. (2009): Funkční anatomie. Grada Publishing, Praha.

Eck S.L., Alavi J.B., Judy K., Phillips P., Alavi A., Hackney D., Cross P., Hughes J., Gao G., Wilson J.M., Propert K. (2001): Treatment of recurrent or progressive malignant glioma with a recombinant adenovirus expressing human interferon-beta (H5.010CMVhIFN-beta): a phase I trial. *Human Gene Therapy* 12: 97–113.

Ehler E. (2006): Zvláštnosti symptomatologie některých mozkových nádorů. Sborník program, odborné přednášky. XIII. Postgraduální kurz v neurochirurgii, 5.4.-7.4. 2006, Hradec Králové. Vydala neurochirurgická klinika, FN, Hradec Králové. ISBN 80-239-6809-2.

Eoli M., Menghi F., Bruzzone M.G., De Simone T., Valletta L., Pollo B., Bissola L., Silvani A., Bianchessi D., D'Incerti L., Filippini G., Broggi G., Boiardi A., Finocchiaro G. (2007): Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of

heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. *Clinical Cancer Research* 13: 2606–2613.

Eriksen J.G., Steiniche T., Overgaard J. (2005): The influence of epidermal growth factor receptor and tumor differentiation on the response to accelerated radiotherapy of squamous cell carcinomas of the head and neck in the randomized DAHANCA 6 and 7 study. *Radiotherapy and Oncology* 74: 93-100.

Felsberg J., Erkwoh A., Sabel M.C., Kirsch L., Fimmers R., Blaschke B., Schlegel U., Schramm J., Wiestler O.D., Reifenberger G. (2004): Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathology* 14: 121-130.

Fenstermaker R.A., Ciesielski M.J. (2007): EGFR Intron Recombination in Human Gliomas: Inappropriate Diversion of V(D)J Recombination? *Current Genomics* 8: 163-170.

Fernandez P.C., Frank S.R., Wang L., Schroeder M., Liu S., Greene J., Cocito A., Amati B. (2003): Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes & Development* 17: 1115-1129.

Filippini G., Falcone C., Boiardi A., Broggi G., Bruzzone M.G., Caldiroli D., Farina R., Farinotti M., Fariselli L., Finocchiaro G., Giombini S., Pollo B., Savoiaro M., Solero C.L., Valsecchi M.G. (2008): Prognostic factors for survival in 676 consecutive patients with newly diagnosed primary glioblastoma. *Neuro-Oncology* 10: 79-87.

Foulkes W.D., Flanders T.Y., Pollock P.M., Haywardt N.K. (1997): The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Molecular Medicine* 1: 5-20.

Frappaz D., Chinotn O., Bataillard A., Ben Hassel M., Capelle L., Chanalet S., Chatel M., Figarella-Branger D., Guegan Y., Guyotat J., Hoang-Xuan K., Jouanneau E., Keime-Guibert F., Lafore C., Linassier C., Loiseau H., Maire J.P., Menei P., Rousmans S., Sanson M., Sunyach M.P. (2003): Summary version of the Standards, Options and Recommendations for the management of adult patients with intracranial glioma (2002). *British Journal of Cancer* 89: 573-583.

Gardner L., Lee L., Dang C. (2002): The c-Myc Oncogenic Transcription factor. In *The Encyclopedia of Cancer*. Academic Press, Second Edition.

Gillett C., Fantl V., Smith R., Fisher C., Bartek J., Dickson C., Barnes D., Peters G. (1994): Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Research* 54: 1812–1817.

Giralt J., de las Heras M., Cerezo L., Eraso A., Hermosilla E., Velez D., Lujan J., Espin E., Rosello J., Majó J., Benavente S., Armengol M., de Torres I. (2005): The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis. *Radiotherapy & Oncology* 74: 101-108.

Goberdhan D.C.I., Wilson C. (2003): PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Human Molecular Genetics* 12: R239-R248.

Godard S., Getz G., Delorenzi M., Farmer P., Kobayashi H., Desbaillets I., Nozaki M., Diserens A.C., Hamou M.F., Dietrich P.Y., Regli L., Janzer R.C., Bucher P., Stupp R., de Tribolet N., Domany E., Hegi M.E. (2003): Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Research* 63: 6613-6625.

Grover R., Grobbelaar A.O., Hudson D.A., Forder M., Wilson G.D., Sanders R. (1997): The clinical significance of oncogene expression in subungual melanoma. *British Journal of Plastic Surgery* 50: 15-19.

Guensberg P., Wacheck V., Lucas T., Monia B., Pehamberger H., Eichler H.G., Jansen B. (2002): Bcl-xL antisense oligonucleotides chemosensitize human glioblastoma cells. *Chemotherapy* 48: 189–195.

Haas-Kogan D.A., Prados M.D., Tihan T., Eberhard D.A., Jelluma N., Arvold N.D., Baumber R., Lamborn K.R., Kapadia A., Malec M., Berger M.S., Stokoe D. (2005): Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *Journal of the National Cancer Institute* 97: 880–887.

Hall M., Peters G. (1996): Genetic alterations of cyclins, cyclindependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Advances in Cancer Research* 68: 67-108.

Han J.Y., Lee G.K., Jang D.H., Lee S.Y., Lee J.S. (2008): Association of p53 codon 72 polymorphism and MDM2 SNP309 with clinical outcome of advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 113: 799-807.

Haroun R.I., Clatterbuck R.E., Gibbons M.C., Burger P.C., Parker R., Fruehauf J.P., Brem H. (2002): Extreme drug resistance in primary brain tumors: In vitro analysis of 64 resection specimens. *Journal of Neuro-Oncology* 58: 115–123.

Hartl J., Bohuněk V., Klapetek J., Travěnc J. (1985): *Speciální neurologie*. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Olomouc.

Hartmann C., Meyer J., Balss J., Capper D., Mueller W., Christians A., Felsberg J., Wolter M., Mawrin C., Wick W., Weller M., Herold-Mende C., Unterberg A., Jeuken J.W., Wesseling P., Reifenberger G., von Deimling A. (2009): Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathologica* 118: 469–474.

Hashimoto H., Daimaru Y., Enjoji M., Nakagawara A. (1989): N-myc gene product expression in neuroblastoma. *Journal of Clinical Pathology* 42: 52-55.

Hegi M.E., Diserens A.C., Gorlia T., Hamou M.F., de Tribolet N., Weller M., Kros J.M., Hainfellner J.A., Mason W., Mariani L., Bromberg J.E., Hau P., Mirimanoff R.O., Cairncross J.G., Janzer R.C., Stupp R. (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 352: 997-1003.

Hermans A., Heisterkamp N., von Lindern M., van Baal S., Meijer D., van der Plas D., Wiedemann L. M., Groffen J., Bootsma D., Grosveld G. (1987): Unique fusion of BCR and c-ABL genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 51: 33–40.

Herms J.W., von Loewenich F.D., Behnke J., Markakis E., Kretschmar H.A. (1999): c-myc oncogene family expression in glioblastoma and survival. *Surgical Neurology* 51: 536–542.

Herschkowitz J.I., He1 X., Fan Ch., Perou Ch. M. (2008): The functional loss of the retinoblastoma tumour suppressor is a common event in basal-like and luminal B breast carcinomas. *Breast Cancer Research* 10: R75.

Hibberts N.A., Simpson D.J., Bicknell J.E., Broome J.C., Hoban P.R., Clayton R.N., Farrell W.E. (1999): Analysis of cyclin D1 (CCND1) allelic imbalance and overexpression in sporadic human pituitary tumors. *Clinical Cancer Research* 5: 2133–2139.

Hirsch F.R., Varella-Garcia M., Bunn P.A. Jr, Di Maria M.V., Veve R., Bremnes R.M., Barón A.E., Zeng CH., Franklin W.A. (2003): Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology* 21: 3798-3807.

Hosszú T., Kanta M., Česák T., Řehák S. (2006): Molekulární genetika mozkových nádorů, možnosti v léčbě. Sborník program, odborné přednášky. XIII. Postgraduální kurz v neurochirurgii, 5.4.-7.4. 2006, Hradec Králové. Vydala neurochirurgická klinika, FN, Hradec Králové. ISBN 80-239-6809-2.

Houillier C., Lejeune J., Benouaich-Amiel A., Laigle-Donadey F., Criniere E., Mokhtari K., Thillet J., Delattre J.Y., Hoang-Xuan K., Sanson M. (2006): Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer* 106: 2218-2223.

<http://med.stanford.edu/ism/2009/september/glia-0921.html> [25.3.2011].

<http://www.bio-itworld.com/issues/2008/april/amgen.html> [25.3.2011]

[http://www.creative-biomart.com/description\\_339\\_4.htm](http://www.creative-biomart.com/description_339_4.htm) [25.3.2011].

<http://www.genedetect.com/insitu.htm> [25.3.2011].

<http://www.linkos.cz> [25.3.2011].

<http://www.mayoclinic.org/glioma/enlargeimage4900.html> [12.1.2011].

<http://www.svod.cz> [25.3.2011].

Huang B., Starostik P., Kühl J., Tonn J.C., Roggendorf W. (2002): Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human ependymomas. *Acta Neuropathologica* 103: 415-420.

Huang P.H., Mukasa A., Bonavia R., Flynn R.A., Brewer Z.E., Cavenee W.K., Furnari F.B., White F.M. (2007): Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 12867–12872.

Hui A.B., Lo K.W., Yin X.L., Poon W.S., Ng H.K. (2001): Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization. *Laboratory Investigation* 81: 717–723.

Hulleman E., Helin K. (2005): Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Advances in Cancer Research* 94: 1–27.

Huncharek M., Kupelnick B. (2000): Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis. *Oncology Research* 12: 107 – 112.

Ichimura K., Pearson D.M., Kocialkowski S., Bäcklund L.M., Chan R., Jones D.T., Collins V.P. (2009): IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro-Oncology* 11: 341–347.

Ino Y., Silver J.S., Blazejewski L., Nishikawa R., Matsutani M., von Deimling A., Louis D.N. (1999): Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 58: 881–885.

Ishikawa T., Furihata M., Ohtsuki Y., Murakami H., Inoue A., Ogoshi S. (1998): Cyclin D1 overexpression related to retinoblastoma protein expression as a prognostic marker in human oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 77: 92-97.

Iwadata Y., Mochizuki S., Fujimoto S., Namba H., Sakiyama S., Tagawa M., Yamaura A. (2000): Alteration of CDKN2/p16 in human astrocytic tumors is related with increased susceptibility to antimetabolite anticancer agents. *International Journal of Oncology* 17: 501–505.

Izzo J.G., Papadimitrakopoulou V.A., Li X.Q., Ibarguen H., Lee J.S., Ro J.Y., El-Naggar A., Hong W.K., Hittelman W.N. (1998): Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene* 17: 2313–2322.

Jares P., Colomer D., Campo E. (2007): Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 7: 750–762.

Jenkins R.B., Qian J., Lieber M.M., Bostwick D.G. (1997): Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Research* 57: 524-531.

Jiang Z., Pore N., Cerniglia G.J., Mick R., Georgescu M.M., Bernhard E.J., Hahn S.M., Gupta A.K., Maity A. (2007): Phosphatase and tensin homologue deficiency in glioblastoma confers resistance to radiation and temozolomide that is reversed by the protease inhibitor nelfinavir. *Cancer Research* 67: 4467–4473.

Jin M., Inoue S., Umemura T., Moriya J., Arakawa M., Nagashima K., Kato H. (2001): Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II. *Lung Cancer* 34: 207–218.

Kala M. (1998): *Maligní nádory mozku dospělého věku*. Nakladatelství Galén, Praha.



Kala M. (2007): Nádorová onemocnění nervové soustavy. In: Kaňovský P., Herzig R. *et al.* (2007): Speciální neurologie. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Olomouc.

Kamb A., Gruis N.A., Weaver-Feldhaus J., Liu Q., Harshman K., Tavtigian S.V., Stockert E., Day R.S., Johnson B.E., Skolnick M.H. (1994): A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440.

Kamiryo T., Tada K., Shiraishi S., Shinojima N., Nakamura H., Kochi M., Kuratsu J., Sava H., Ushio Y. (2002): Analysis of homozygous deletion of the p16 gene and correlation with survival in patients with glioblastoma multiforme. *Journal of Neurosurgery* 96: 815–822.

Kamiya M., Nakazato Y. (2002): The expression of p73, p21 and MDM2 proteins in gliomas. *Journal of Neurooncology* 59: 143-149.

Kanu O.O., Hughes B., Di C., Lin N., Fu J., Bigner D.D., Yan H., Adamson C. (2009): Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clinical Medicine, Oncology* 3: 39–52.

Keller O., Jedlička P. (2005): Speciální neurologie. Nakladatelství Galén a nakladatelství Karolinum, Praha.

Kim H.D., Guo T.W., Wu A.P., Wells A., Gertler F.B., Lauffenburger D.A. (2008): Epidermal growth factor-induced enhancement of glioblastoma cell migration in 3D arises from an intrinsic increase in speed but an extrinsic matrix- and proteolysis-dependent increase in persistence. *Molecular Biology of the Cell* 19: 4249–4259.

Kim J.K., Diehl A. (2009): Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. *Journal of Cellular Physiology* 220: 292-296.

Kim K.E., Kim K.U., Kim D.C., Park J.I., Han J.Y. (2009): Cytogenetic characterizations of central nervous tumors: The first comprehensive report from a single institution in Korea. *Journal of Korean Medical Science* 24: 453-460.

Kleihues P., Cavenee W.K. (2000): Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lion: IARC Press.

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

Klener P. (2002): *Klinická onkologie*. Nakladatelství Galén a nakladatelství Karolinum, Praha.

Klijn J.G., Berns P.M., Schmitz P.I., Foekens J.A. (1992): The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocrine Reviews* 13: 3-17.

Knobbe Ch.B., Merlo A., Reifemberger G. (2002): Pten signaling in gliomas. *Neuro-Oncology* 4: 196–211.

Kočárek E., Pánek M., Novotná D. (2006): *Klinická cytogenetika I*. Nakladatelství Karolinum, Praha.

Kondo T., Ezzat S., Asa S.L. (2006): Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature Reviews Cancer* 6: 292-306.

Korkolopoulou P., Christodoulou P., Kouzelis K., Hadjiyannakis M., Priftis A., Stamoulis G., Seretis A., Thomas-Tsagli E. (1997): MDM2 and p53 expression in gliomas: a multivariate survival analysis including proliferation markers and epidermal growth factor receptor. *British Journal of Cancer* 75: 1269-1278.

Koul D. (2008): PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biology and Therapy* 7: 1321-1325.

Kowalczyk A., Filipkowski R.K., Rylski M., Wilczynski G.M., Konopacki F.A., Jaworski J., Ciemerych M.A., Sicinski P., Kaczmarek L. (2004): The critical role of cyclin D2 in adult neurogenesis. *The Journal of Cell Biology* 167: 209-213.

Kozler P., Beneš V., Chytka T., Kramář F. (2007): Intrakraniální nádory. Nakladatelství Galén, Praha.

Kraus J. A., Lamszus K., Glesmann N., Beck M., Wolter M., Sabel M., Krex D., Klockgether T., Reinfenberger G., Schlegel U. (2001): Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial komponent. *Acta Neuropathologica* 101: 311-320.

Kumar H.R., Zhong X., Sandoval J.A., Hickey R.J., Malkas L.H. (2008): Applications of emerging molecular technologies in glioblastoma multiforme. *Expert Review of Neurotherapeutics* 8: 1497-1506.

Labussiere M., Sanson M., Idhah A., Delattre J.Y. (2010): IDH1 gene mutations: a new paradigm in glioma prognosis and therapy? *Oncologist* 15: 196-199.

Laurent E., Talpaz M., Kantarjian H., Kurzrock R. (2001): The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Research* 61: 2343-2355.

Lee N.Y., Hazlett T.L., Koland J.G. (2006): Structure and dynamics of the epidermal growth factor receptor C-terminal phosphorylation domain. *Protein Science* 15: 1142–1152.

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* 275: 1943-1946.

Li M., Jendrossek V., Belka C. (2007): The role of PDGF in radiation oncology. *Radiation Oncology* 2: 5.

Liang Z., Zeng X., Gao J., Wu S., Wang P., Shi X., Zhang J., Liu T. (2008): Analysis of EGFR, HER2, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients. *BMC Cancer* 8: 363.

Liu Y., Ehtesham M., Samoto K., Wheeler C.J., Thompson R.C., Villarreal L.P., Black K.L., Yu J.S. (2002): In situ adenoviral interleukin 12 gene transfer confers potent and long-lasting cytotoxic immunity in glioma. *Cancer Gene Therapy* 9: 9–15.

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

Lund-Johansen M., Bjerkvig R., Humphrey P.A., Bigner S.H., Bigner D.D., Laerum O.D. (1990): Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Research* 50: 6039–6044.

Malec R., Šuba P. (2006): Prostorové schéma rozdělení nitrolebních nádorů. Sborník program, odborné přednášky. XIII. Postgraduální kurz v neurochirurgii, 5.4.-7.4. 2006, Hradec Králové. Vydala neurochirurgická klinika, FN, Hradec Králové. ISBN 80-239-6809-2.

Mardis E.R., Ding L., Dooling D.J., Larson D.E., McLellan M.D., Chen K., Koboldt D.C., Fulton R.S., Delehaunty K.D., McGrath S.D., Fulton L.A., Locke D.P., Magrini V.J., Abbott R.M., Vickery T.L., Reed J.S., Robinson J.S., Wylie T., Smith S.M., Carmichael L., Eldred J.M., Harris C.C., Walker J., Peck J.B., Du F., Dukes A.F., Sanderson G.E., Brummett A.M., Clark E., McMichael J.F., Meyer R.J., Schindler J.K., Pohl C.S., Wallis J.W., Shi X., Lin L., Schmidt H., Tang Y., Haipek C., Wiechert M.E., Ivy J.V., Kalicki J., Elliott G., Ries R.E., Payton J.E., Westervelt P., Tomasson M.H., Watson M.A., Baty J., Heath S., Shannon W.D., Nagarajan R., Link D.C., Walter M.J., Graubert T.A., DiPersio J.F., Wilson R.K., Ley T.J. (2009): Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *New England Journal of Medicine* 361: 1058–1066.

Maru Y., Kobayashi T., Tanaka K., Shibuya M. (1999): Bcr binds to the xeroderma pigmentosum group B protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260: 309–312.

Mathivanan J., Rohini K., Gope M.L., Anandh B., Gope R (2007): Altered structure and deregulated expression of the tumor suppressor gene retinoblastoma (RB1) in human brain tumors. *Molecular and Cellular Biochemistry* 302: 67–77.

Matthay K.K. (2001): MYCN expression in neuroblastoma: A mixed message? *Journal of Clinical Oncology* 18: 3591-3594.

Maurizi M., Almadori G., Ferrandina G., Distefano M., Romanini M.E., Cadoni G., Benedetti-Panici P., Paludetti G., Scambia G., Mancuso S. (1996): Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 74: 1253-1257.

Mazánek P., Bajčiová V., Šterba J., Kuglík P., Veselská R. (2008): Novinky v diagnostice a léčbě neuroblastomu. *Onkológia* 3: 257–2613.

McKay J.A., Murray L.J., Curran S., Ross V.G., Clark C., Murray G.I., Cassidy J., McLeod H.L. (2002): Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *European Journal of Cancer* 38: 2258-2264.

McLendon R. *et al.* (Cancer Genome Atlas Research Network) (2008): Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455: 1061-1068.

Melo J.V. (1996): The diversity of Bcr-Abl fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88: 2375–2384.

Meredith S.D., Levine P.A., Burns J.A., Gaffey M.J., Boyd J.C., Weiss L.M., Erickson N.L., Williams M.E. (1995): Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 121: 790-794.

Michalides R. (1998): Deregulation of cyclin D1 in cancer. In: Mihich E., Croce C., eds. *The biology of tumors*. Plenum Press, New York.

Michalides R.J., van Veelen N.M., Kristel P.M., Hart A.A., Loftus B.M., Hilgers F.J., Balm A.J. (1997): Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 123: 497-502.

Miller C.W., Simon K., Aslo A., Kok K., Yokota J., Buys C.H., Terada M., Koeffler H.P. (1992): p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Research* 52: 1695-1698.

Mitani S., Kamata H., Fujiwara M., Aoki N., Tango T., Fukuchi K., Oka T. (2001): Analysis of c-myc DNA amplification in non-small cell lung carcinoma in comparison with small cell lung carcinoma using polymerase chain reaction. *Clinical and Experimental Medicine* 1: 105-111.

Miyagami M., Tazoe M., Nakamura S. (1998): Expression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in association with neovascularization in human malignant gliomas. *Brain Tumor Pathology* 15: 95-100.

Mizukami Y., Nonomura A., Takizawa T., Noguchi M., Michigishi T., Nakamura S., Ishizaki T. (1995): N-myc protein expression in human breast carcinoma: prognostic implications. *Anticancer Research* 15: 2899-2905.

Momand J., Aspuria P.J., Furuta S. (2005): MDM2 and MDMX regulators of p53 Activity. The p53 tumor suppressor pathway and cancer, edited by Zambetti. Springer Science+Business Media, New York.

Moulton T., Samara G., Chung W.Y., Yuan L., Desai R., Sisti M., Bruce J., Tycko B. (1995): MTS1/p16/CDKN2 lesions in primary glioblastoma multiforme. *American Journal of Pathology* 146: 613-619.

Mumenthaler M., Mattle H. (2001): *Neurologie*. Grada Publishing, Praha.

Muracciole X., Romain S., Dufour H., Palmari J., Chinot O., Ouafik L., Grisoli F., Branger D.F., Martin P.M. (2002): PAI-1 and EGFR expression in adult glioma tumors: toward a

molecular prognostic classification. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 52: 592 – 598.

Nakamura M., Ishida E., Shimada K., Kishi M., Nakase H., Sakaki T., Konishi N. (2005): Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Laboratory Investigation* 85: 165-175.

Natsume A., Tsujimura K., Mizuno M., Takahashi T., Yoshida J. (2000): IFN-beta gene therapy induces systemic antitumor immunity against malignant glioma. *Journal of Neuro-Oncology* 47: 117–124.

Nesbit C.E., Tersak J.M., Prochownik E.V. (1999): MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18: 3004-3016.

Nesković-Konstantinović Z., Nikolić-Vukosavljević D., Branković-Magić M., Kanjer K., Gavrilović D., Mitrović L., Borojević N., Vukotić D., Spuzić I. (1999): Expression of epidermal growth factor receptor in breast cancer, from early stages to advanced disease. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 18: 347-355.

Newcomb E.W., Cohen H., Lee S.R., Bhalla S.K., Bloom J., Hayes R.L., Miller D.C. (1998): Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathology* 8: 655-667.

Newton H.B. (2003): Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 1: Growth factor and Ras signaling pathways. *Expert Review of Anticancer Therapy* 3: 595–614.

Němeček S., Cerman J., Bednařík J., Štourač P., Látr I., Náhlovský J., Česák T., Hobza V., Němečková J., Eliáš P., Mechl M., Vymazal J. (2010): Nádory nervového systému a hypofýzy. In: Bednařík J., Ambler Z., Růžička E., *et al.*: *Klinická neurologie, část speciální I*. Triton, Praha.

Němeček S., Cerman J., Němečková J., Náhlovský J. (2006): Mikroskopická diagnostika neuroepiteliálních nádorů (WHO klasifikace 2000). *Sborník program, odborné přednášky*.

XIII. Postgraduální kurz v neurochirurgii, 5.4.-7.4. 2006, Hradec Králové. Vydala neurochirurgická klinika, FN, Hradec Králové. ISBN 80-239-6809-2.

Nigro J.M., Baker S.J., Preisinger A.C., Jessup J.M., Hostetter R., Cleary K., Bigner S.H., Davidson N., Baylin S., Devilee P., Glover T., Collins F.S., Weslon A., Modali R., Harris C.C., Vogelstein B. (1989): Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708.

Nishizaki T., Ozaki S., Harada K., Ito H., Arai H., Beppu T., Sasaki K. (1998): Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 340-346.

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: 6892-6899.

Ohgaki H., Kleihues P. (2005): Genetic pathways in the evolution of gliomas. *Contemporary Cancer Research: Brain tumors*, edited by F. Ali-Osman, Humana Press Inc., Totowa, New York.

Ohgaki H., Kleihues P. (2007): Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology* 170: 1445-1453.

Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D.L., Vogelstein B. (1992): Amplification of a gene encoding p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358: 80-83.

Oliver T.G., Grasdeder L.L., Carroll A.L., Kaiser C., Gillingham C.L., Lin S.M., Wickramasinghe R., Scott M.P., Wechsler-Reya R.J. (2003): Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 7331-7336.

Pontano L.L., Diehl J.A. (2008): Speeding through cell cycle roadblocks: Nuclear cyclin D1-dependent kinase and neoplastic transformation. *Cell Division* 3: 12.



Radziwill G., Erdmann R.A., Margelisch U., Moelling K. (2003): The Bcr kinase downregulates Ras signaling by phosphorylating AF-6 and binding to its PDZ domain. *Molecular and Cellular Biology* 23: 4663-4672.

Raizer J.J., Abrey L.E., Lassman A.B., Chang S.M., Lamborn K.R., Kuhn J.G., Yung W.K., Gilbert M.R., Aldape K.A., Wen P.Y., Fine H.A., Mehta M., Deangelis L.M., Lieberman F., Cloughesy T.F., Robins H.I., Dancey J., Prados M.D.; North American Brain Tumor Consortium. (2010): A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. *Neuro-Oncology* 12: 95-103.

Rameh L.E., Cantley L.C. (1999): The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *Journal of Biological Chemistry* 274: 8347-8350.

Ranuncolo S.M., Varela M., Morandi A., Lastiri J., Christiansen S., de Kier Joffé E.B., Pallotta M.G., Puricelli L. (2004): Prognostic value of Mdm2, p53 and p16 in patients with astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology* 68: 113–121.

Rasheed A., Herndon J.E., Stenzel T.T., Raetz J.G., Kendelhardt J., Friedman H.S., Friedman A.H., Bigner D.D., Bigner S.H., McLendon R.E. (2002): Molecular markers of prognosis in astrocytic tumors. *Cancer* 94: 2688 – 2697.

Rasheed B.K., Wiltshire R.N., Bigner S.H., Bigner D.D. (1999): Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Current Opinion in Oncology* 11: 162-167.

Reed J.A., Loganzo F. Jr., Shea C.R., Walker G.J., Flores J.F., Glendening J.M., Bogdany J.K., Shiel M.J., Haluska F.G., Fountain J.W. (1995): Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Research* 55: 2713-2718.

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 Research* 53: 2736–2739.

Reitman Z.J., Parsons D.W., Yan H. (2010): IDH1 and IDH2: Not Your Typical Oncogenes. *Cancer Cell* 17: 225-234.

Riemenschneider M.J., Reifenberger G. (2009): Molecular neuropathology of gliomas. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 184-212.

Roncalli M., Viale G., Grimelius L., Johansson H., Wilander E., Alfano R.M., Springall D., Battezzati P.M., Polak J.M., Coggi G. (1994): Prognostic value of N-myc immunoreactivity in medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 74: 134-141.

Rosypal S. (2000): Úvod do molekulární biologie. SPN, Brno.

Ruano Y., Mollejo M., Ribalta T., Fiaño C., Camacho F.I., Gómez E., de Lope A.R., Hernández-Moneo J.L., Martínez P., Meléndez B. (2006): Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling. *Molecular Cancer* 5: 39.

Sang H.U., Banaie A., Rigby L., Chen J., Meltzer H. (2000): Alteration in p53 modulates glial proteins in human glial tumour cells. *Journal of Neuro-Oncology* 48: 191–206.

Sathornsumetee S., Rich J.N. (2006): New treatment strategies for malignant gliomas. *Expert Review of Anticancer Therapy* 6: 1087–1104.

Sauter G., Maeda T., Waldman F.W., Davis R.L., Feuerstein B.G. (1996): Patterns of epidermal Growth factor receptor amplification in malignant gliomas. *American Journal of Pathology* 148: 1047-1053.

Schiebe M., Ohneseit P., Hoffmann W., Meyermann R., Rodemann H.P., Bamberg M. (2000): Analysis of mdm2 and p53 gene alterations in glioblastomas and its correlation with clinical factors. *Journal of Neurooncology* 49: 197-203.

Schlegel J., Merdes A., Stumm G., Albert F.K., Forsting M., Hynes N.E., Kiessling M. (1994): Amplification of the epidermal growth factor receptor gene correlates with

different growth behaviour in human glioblastoma. *International Journal of Cancer* 56: 72-77.

Schor N.F. (2009): Pharmacotherapy for Adults with Tumors of the Central Nervous System. *Pharmacology & Therapeutics* 121: 253–264.

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 Research* 54: 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. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 61: 321 – 328.

Seeger R.C., Brodeur G.M., Sather H., Dalton A., Siegel S.E., Wong K.Y., Hammond D. (1985): Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *New England Journal of Medicine* 313: 1111-1116.

Sharma G.M. (2008): Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) and its Role in Tumour Progression to Malignancy. *Online Journal of Health and Allied Sciences* 7: 6.

Shin K.Y., Kong G., Kim W.S., Lee T.Y., Woo Y.N., Lee J.D. (1997): Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancers. *British Journal of Cancer* 75: 1788-1792.

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: 6962-6970.

Simon M., Voss D., Park-Simon T.W., Mahlberg R., Koster G. (2006): Role of p16 and p14ARF in radio- and chemosensitivity of malignant gliomas. *Oncology Reports* 16: 127–132.

Simmons M.L., Lamborn K.R., Takahashi M., Chen P., Israel M.A., Berger M.S., Godfrey T., Nigro J., Prados M., Chang S., Barker F.G., Aldape K. (2001): Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Research* 61: 1122-1128.

Simpson J.R., Horton J., Scott C., Curran W.J., Rubin P., Fischbach J., Isaacson S., Rotman M., Asbell S.O., Nelson J.S. (1993): Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 26: 239-244.

Siráč I., Hartlová J., Petera J., Vošmik M., Ryška A., Vošmiková H. (2008): Receptor pro epidermální růstový faktor a jeho úloha v radioterapii. *Klinická onkologie* 21: 338-347.

Sjöblom T., Jones S., Wood L.D., Parsons D.W., Lin J., Barber T.D., Mandelker D., Leary R.J., Ptak J., Silliman N., Szabo S., Buckhaults P., Farrell C., Meeh P., Markowitz S.D., Willis J., Dawson D., Willson J.K., Gazdar A.F., Hartigan J., Wu L., Liu C., Parmigiani G., Park B.H., Bachman K.E., Papadopoulos N., Vogelstein B., Kinzler K.W., Velculescu V.E. (2006): The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314: 268–274.

Smith J.S., Perry A., Borell T.J., Lee H.K., O'Fallon J., Hosek S.M., Kimmel D., Yates A., Burger P.C., Scheithauer B.W., Jenkins R.B. (2000): Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *Journal of Clinical Oncology* 18: 636–645.

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., Buckner J.C., Jenkins R.B. (2001): PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *Journal of the National Cancer Institute* 93: 1246-1256.

Stam K., Heisterkamp N., Grosveld G., de Klein A., Verma R.S., Coleman M., Dosik H., Groffen J. (1985): Evidence of a new chimeric BCR/c-ABL mRNA in patients with

chronic myelocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *The New England Journal of Medicine* 313: 1429–1433.

Stark A.M., Hugo H.H., Witzel P., Mihajlovic Z., Mehdorn H.M. (2003): Age-related expression of p53, Mdm2, EGFR and Msh2 in glioblastoma multiforme. *Zentralblatt für Neurochirurgie* 64: 30-36.

Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenhauer E., Mirimanoff R.O.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 352: 987-996.

Sumrejkanchanakij P., Tamamori-Adachi M., Matsunaga Y., Eto K., Ikeda M.A. (2003): Role of cyclin D1 cytoplasmic sequestration in the survival of postmitotic neurons. *Oncogene* 22: 8723-8730.

Sun H., Chang Y., Schweers B., Dyer M.A., Zhang X., Hayward S.W., Goodrich D.W. (2006): An E2F Binding-Deficient Rb1 Protein Partially Rescues Developmental Defects Associated with Rb1 Nullizygosity. *Molecular and Cellular Biology* 26: 1527–1537.

Suzuki S.O., Iwaki T. (2000): Amplification and overexpression of mdm2 gene in ependymomas. *Modern Pathology* 13: 548–553.

Tan P.G., Xing Z., Li Z.Q. (2004): Expression of cyclin D1 in brain gliomas and its significance. *Ai Zheng* 23: 63-65.

Terada K., Tamiya T., Daido S., Kambara H., Tanaka H., Ono Y., Matsumoto K., Ito S., Ouchida M., Ohmoto T., Shimizu K. (2002): Prognostic value of loss of heterozygosity around three candidate tumor suppressor genes on chromosome 10q in astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology* 58: 107 – 114.

Thaker N.G., Pollack I.F. (2009): Molecularly targeted therapies for malignant glioma: rationale for combinatorial strategies. *Expert Review of Neurotherapeutics* 9: 1815-1836.

Tsuda T., Obara M., Hirano H., Gotoh S., Kubomura S., Higashi K., Kuroiwa A., Nakagawara A., Nagahara N., Shimizu K. (1987): Analysis of N-myc amplification in relation to disease stage and histologic types in human neuroblastomas. *Cancer* 60: 820-826.

Vaněčková M., Seidl Z. (2004): *Zobrazovací metody, nové možnosti a poznatky – expanzivní léze, záněty, úrazy, degenerativní změny mozku, míchy a páteře (část 2.)*. *Interní medicína pro praxi* 11: 535-541.

Venter D.J., Thomas D.G.T. (1991): Multiple sequential molecular abnormalities in the evolution of human gliomas. *British Journal of Cancer* 63: 753-757.

Wang J., Wang H., Li Z., Wu Q., Lathia J.D., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N. (2008): c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. *PLoS One* 3: e3769.

Wemmert S., Ketter R., Rahnenführer J., Beerenwinkel N., Strowitzki M., Feiden W., Hartmann C., Lengauer T., Stockhammer F., Zang K.D., Meese E., Steudel W.I., von Deimling A., Urbschat S. (2005): Patients with high-grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment. *Neoplasia* 7: 883-893.

Wippold F.J., Perry A. (2007): *Neuropathology for the Neuroradiologist: Fluorescence in Situ Hybridization*. *American Journal of Neuroradiology* 28: 406-410.

Wong A.J., Bigner S.H., Bigner D.D., Kinzler K.W., Hamilton S.R., Vogelstein B. (1987): Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 6899-6903.

Wu L., Maki C.G. (2005): *MDM2: RING Finger Protein and Regulator of p53*. *Zinc Finger Proteins: From Atomic Contact to Cellular Function*, edited by Shiro Luchi and

Natalie Kuldell.©2005 Landes Bioscience/Eurekah.com and Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Yamada K.M., Araki M. (2001): Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *Journal of Cell Science* 114: 2375–2382.

Yan H., Parsons D.W., Jin G., McLendon R., Rasheed B.A., Yuan W., Kos I., Batinic-Haberle I., Jones S., Riggins G.J., Friedman H., Friedman A., Reardon D., Herndon J., Kinzler K.W., Velculescu V.E., Vogelstein B., Bigner D.D. (2009): IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England Journal of Medicine* 360: 765–773.

Yang J.L., Ow K.T., Russell P.J., Ham J.M., Crowe P.J. (1996): Higher expression of oncoproteins c-myc, c-erb B-2/neu, PCNA, and p53 in metastasizing colorectal cancer than in nonmetastasizing tumors. *Annals of Surgical Oncology* 3: 574–579.

Yu X., Sharma K.D., Takahashi T., Iwamoto R., Mekada E. (2002): Ligand-independent Dimer Formation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Is a Step Separable from Ligand-induced EGFR Signaling. *Molecular Biology of the Cell* 13: 2547–2557.

Zhang C., Beckermann B., Kallifatidis G., Liu Z., Rittgen W., Edler L., Büchler P., Debatin K.M., Büchler M.W., Friess H., Herr I. (2006): Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *International Journal of Oncology* 29: 1295–1301.

Zhang X., Zhao M., Huang A.Y., Fei Z., Zhang W., Wang X.L. (2005): The effect of cyclin D expression on cell proliferation in human gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience* 12: 166-168.

Zhao X., D'Arca D., Lim W.K., Brahmachary M., Carro M.S., Ludwig T., Cardo C.C., Guillemot F., Aldape K., Califano A., Iavarone A., Lasorella A. (2009): The N-Myc-DLL3 cascade is suppressed by the ubiquitin ligase Huwe1 to inhibit proliferation and promote neurogenesis in the developing brain. *Developmental Cell* 17: 210-221.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2HG	R(-)-2-hydroxyglutarát
aCGH	Array comparative genomic hybridization
ACTH	Adrenokortikotropní hormon
Akt	Rodina signálních Ser/Thr protein-kináz
ARF	Tumor supresor
$\alpha$ KG	$\alpha$ -ketoglutarát
Bcl-xL	Antiapoptotický člen Bcl-2 rodiny
BCNU	1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea
BCR	Breakpoint cluster region
CASP8	Kaspáza 8
CCND1	Cyklin D1
cdc25A	Fosfatáza
CDK4	Cyklin-dependentní kináza 4
CDKN2A/B	Gen, kódující inhibitory CDK p14 a p16
CEP	Centromerická sonda: Centromeric Enumeration Probes
CKI	Inhibitor cyklin dependentní kinázy
CML	Chronická myeloidní leukémie
CMR1	Cold and menthol-sensitive receptor 1
CNS	Centrální nervová soustava
CT	Počítačová tomografie
DAPI	4',6-diamino-2-fenylyndol
DFMO	d,1- $\alpha$ -difluoromethylornithine
DFP	Přežití bez nemoci: Disease-free survival
DLL3	Delta-like protein 3
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EEG	Elektroencefalogram
EGF	Epidermální růstový faktor: Epidermal Growth Factor
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor: Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
E2F	Transkripční faktor



Fas	Receptor/ligand buněčné smrti
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace: Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridisation
GBM	Glioblastoma multiforme
GSK3 $\beta$	Gen kódující glykogensyntázu kinázu 3: Glycogen synthase kinase 3
HB-EGF	Heparin-Binding EGF-like growth factor
HER1, 2, 3, 4	Členové erbB rodiny tyrozinkinázových receptorů
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$
HLH LZ	Helix-loop-helix leucine zipper
IDH1/2	Gen pro NADP <sup>+</sup> -dependentní izocitrát dehydrogenázu 1/2
ISH	<i>in situ</i> hybridizace
kb	Tisíce nukleotidových párů: kilo base pairs
kD	kiloDalton
LEM	Laboratoř experimentální medicíny
LOH	Loss of heterozigosity
LSI	Lokusově specifická sonda: Locus Specific Identifier
Mad	Dimerizační partner C-myc proteinu
MAPK	Mitogeny aktivovaná proteinkináza: Mitogen Activated Protein Kinase
Max	Dimerizační partner c-myc proteinu: myc-associated factor X
MDM2/4	Murine Double Minute 2/4
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
M <sub>r</sub>	Molekulární hmotnost
MR	Magnetická rezonance
MS	Hmotnostní spektrometrie: Mass Spectrometry
N-CAM	Neural cell adhesion molekule
PDGF	Destičkový růstový faktor: Platelet-derived growth factor,
PDGFR	Receptor pro destičkový růstový faktor: Platelet-derived growth factor receptor
PET	Pozitronová emisní tomografie
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza
PKC	Protein kináza C
PLC- $\gamma$	Phosphoinositide phospholipase C
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog; nádorový supresor

Raf	Proteinkináza, gen kódující proteinkinázu
Ras	C- RAS, H- RAS (Ha- RAS), K- RAS (Ki- RAS) a N- RAS protonkogeny (Rat Sarcoma Virus)
RB1	Tumor supresorový gen pro retinoblastom
RNA	Ribonukleová kyselina
SELDI TOF	Surface-enhanced laser desorption/ionization Time-of-flight
Shh	Signální dráha Sonic hedgehog
SN38	7-Ethyl-10-Hydroxy-20(S)-Camptothecin
SPECT	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie
SVOD	Software pro Vizualizaci Onkologických Dat
STH	Růstový hormon
TGF $\alpha$	Transformující růstový faktor alfa: Transforming growth factor beta
TK1	Gen pro thymidinkinázu
TP53	Tumor supresorový gen p53
UTR	Netranslatovaná oblast: Untranslated region
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor: Vascular endothelial growth factor
WB	Promývací pufr: wash buffer
WCP	Celochromozomová sonda: Whole Chromosome Painting
WHO	Světová zdravotnická organizace: World Health Organization
WSI	Promývací roztok 1: washing solution 1
WSII	Promývací roztok 2: washing solution 2
XPB	ATP dependentní DNA helikáza: xeroderma pigmentosum group B