

STUDIUM POLYZOMIE CHROMOZOMU 7, MONOZOMIE CHROMOZOMU 10, AMPLIFIKACE GENU EGFR A DELECE GENU P53 U MULTIFORMNÍHO GLIOBLASTOMU POMOCÍ METODY FLUORESCENČNÍ IN SITU HYBRIDIZACE (FISH)

STUDY OF POLYSOMY OF CHROMOSOME 7, MONOSOMY OF CHROMOSOME 10, EGFR GENE AMPLIFICATION AND P53 DELETION IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME USING FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)

NEČESALOVÁ E.*, KUGLÍK P.**, CEJPEK P.***, VESELSKÁ R.*, VRANOVÁ R.**, PEŠÁKOVÁ M.****, RELICHOVÁ J.**

*LABORATOŘ TKÁŇOVÝCH KULTUR, BIOLOGICKÝ ÚSTAV, LÉKAŘSKÁ FAKULTA MU, BRNO
**KATEDRA GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MU, BRNO
***NEUROCHIRURGICKÁ KLINIKA FN BRNO, PRACoviSTĚ MEDICÍNY DospĚLÉHO VĚKU
****ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY FN BRNO, PRACoviSTĚ MEDICÍNY DĚTSKÉHO VĚKU

Souhrn

Východisko: Multiformní glioblastom (GBM, astrocytom grade IV) představuje nejčastější primární nádor centrálního nervového systému u dospělých, který vykazuje vysokou genetickou a histomorfologickou variabilitu. Proto jsou v posledních letech intenzivně studovány specifické strukturní a početní chromozomové abnormality, které by mohly být využity ke genetické subklasifikaci tohoto typu nádoru, upřesnění prognózy a tím i individualizaci způsobu léčby. **Metody a výsledky:** V tomto sdělení prezentujeme výsledky molekulárně cytogenetických analýz histologicky ověřených vzorků nádorové tkáně u souboru 27 pacientů s diagnózou multiformního glioblastomu. Pomocí techniky interfázní fluorescenční hybridizace *in situ* (I-FISH) jsme v nádorové tkáni odebrané z centrální i periferní části nádoru vyšetřovali počty kopií chromozomu 7 a 10, amplifikaci genu EGFR a delecí genu p53. Monozomie chromozomu 10 byla prokázána u 100 % pacientů, polyzomii chromozomu 7 (od 2 do 5 kopií chromozomu 7) jsme našli u 93 % pacientů, amplifikace genu EGFR byla zjištěna u 26 % pacientů a delecce genu p53 u 22 % pacientů ze studovaného souboru. **Závěry:** Naše výsledky prokázaly, že GBM je charakteristický výskytem specifických chromozomových abnormalit, které lze využít jako genetické markery pro diagnostické účely. V práci jsou diskutovány sledované abnormality genomu z hlediska prognózy nemoci a citlivosti k terapii.

Klíčová slova: Multiformní glioblastom, chromozomové aberace, fluorescenční hybridizace *in situ*, monozomie chromozomu 10, polyzomie chromozomu 7, amplifikace genu EGFR, delecce genu p53,

Summary

Backgrounds. Glioblastoma multiforme (GBM, grade IV astrocytoma) is the most common adult primary brain tumor with high genetic and histomorphological variability. Cytogenetic diagnostic methods represent recently an integral part of glioblastoma diagnostics. Different types of glioblastomas are associated with distinct chromosomal aberrations that may provide useful information with respect to tumor classification, prognosis prediction, and response to therapy. **Methods and Results.** In this study, we present the molecular cytogenetic results of tumor specimens from 27 patients with glioblastoma multiforme diagnosis. We investigated chromosomal abnormalities in touch preparations from central and peripheral parts of the tumor by interphase-fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH). This method was used to detect the incidence of the most frequent genetic abnormalities such as the polysomy of chromosome 7, monosomy of chromosome 10, the EGFR gene amplification, and p53 deletion. The results of I-FISH analyses showed monosomy 10 in 100 % of cases, polysomy 7 (2-5 copies of chromosome 7) in 93 % of cases, EGFR gene amplification was present in 26 % of tumors and p53 gene deletion in 22 % of cases. **Conclusions.** Our results confirm high frequency of cytogenetic abnormalities involved in the pathogenetic process of GBM which can be used as specific diagnostic and predictive markers.

Key words: glioblastoma multiforme, chromosomal abnormalities, fluorescence *in situ* hybridization, polysomy of chromosome 7, monosomy of chromosome 10, gene EGFR amplification, gene p53 deletion.

Úvod

Multiformní glioblastom (GBM, astrocytom grade IV) představuje nejčastější primární nádor centrálního nervového systému dospělých. Vyskytuje se s četností 5 až 7 případů na 100 000 jedinců za rok, postihuje častěji muže než ženy v poměru 3:2 (1) a navzdory komplexnímu terapeutickému přístupu (chirurgické odstranění, chemoterapie, radioterapie) je léčba GBM dosud málo úspěšná. Doba přežití většiny pacientů s GBM po stanovení diagnózy je menší než 1 rok (2,3).

Multiformní glioblastom je nádor CNS z nezralých glií. Patří tedy mezi astrocytické tumory, které vycházejí z podpůrné nervové tkáně. Difúzní astrocytické gliomy se mohou vyskytovat v jedné ze tří histologicky definovaných forem: astrocytom (stadium II), anaplastický astrocytom (grade III) a multiformní glioblastom (grade IV).

Histologicky můžeme odlišit dva typy GBM, a to primární a sekundární. Primární GBM (60 %) se vyskytuje převážně u pacientů po padesátém roku věku. Po krátké klinické anamnéze, obvykle méně než 3 měsíce, se projevuje *de novo* (tj. bez klinického nebo histopatologického důkazu dříve existující maligní léze). Sekundární GBM (40 %) se rozvíjí u mladších pacientů (<45 let). Tento typ nádoru se vyvíjí pomaleji z astrocytomů nižšího stupně a očekává se u něj lepší prognóza (4,5).

Již název multiformní glioblastom udává, že tento nádor vykazuje vysokou histomorfologickou variabilitu. Tato charakteristika činí velice problematickou jak histologickou diagnózu, prognózu vývoje nádoru, tak i stanovení optimální terapie. Proto se v literatuře posledních let objevuje řada prací zaměřených na detekci specifických strukturních a nebo početních chromozomových aberací, které by pomohly k přesnější genetické subklasifikaci tohoto typu nádoru a tím i predikci jeho chování.

K nejběžnějším početním cytogenetickým změnám nalezeným u pacientů s GBM patří částečná nebo kompletní ztráta chromozomu 10 (70-85 %) (5,6,7,8,9) a polyzomie chromozomu 7 (50-80 %) (1,5,9,10,11), popsány však byly i početní změny dalších chromozomů jako např. nadbytečné chromozomy 12, 13, 17, 20, či ztráty chromozomů 1, 8, 13, 14, 17, 19, 22 a Y (10,11,12,13).

Z hlediska strukturních aberací jsou popisovány časté delecce ramen 9p, 13q, 14q, 17p, 19q, 22q, či nadbytečný materiál v úsecích 3q, 4p, 7p, 7q, 12q, 19p, 20p, 20q (1, 9, 11, 13, 14, 15).

Opakovaně byla prokázána zejména amplifikace genu EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor) v oblasti 7p12 a některých dalších onkogenů (16,17,18). U primárního GBM se amplifikace genu EGFR vyskytuje v 30-40 % (2,19).

Mezi další často pozorované změny patří mutace nebo ztráta genu p53 (17p13.1). Mutace genu p53 je běžnější u pacientů mezi 18 a 50 rokem (44 %) ve srovnání se staršími pacienty (9 %). U primárního GBM se vyskytuje pouze u 10 % pacientů, zatímco u sekundárního GBM je mutace p53 přítomna u 65 % pacientů (2,4,20).

V našich studiích jsme se zaměřili na molekulárně cytogenetické analýzy vzorků nádorové tkáně u souboru pacientů s diagnózou multiformního glioblastomu, kteří byli operováni v letech 2001 - 2005 na Neurochirurgické klinice FN Brno - Bohunice. Cílem této studie bylo vyšetřit pomocí techniky interfázni fluorescenční hybridizace *in situ* (I-FISH) nejčastěji popisované chromozomové abnormality, které mohou sloužit nejen k bližší genetické charakterizaci jednotlivých subtypů GBM, ale navíc mohou dle literárních údajů ovlivnit i volbu terapie. Z těchto důvodů jsme v našem studovaném souboru pacientů sledovali polyzomii chromozomu 7, monozomii chromozomu 10, amplifikaci genu EGFR a delecii genu p53.

Pacienti a metody

Materiál pro molekulárně cytogenetické analýzy byl získán extirpací mozkového nádoru pacientů s diagnostikovaným GBM na Neurochirurgické klinice Fakultní nemocnice Brno. Výzkumný projekt byl schválen etickou komisí.

Výchozím materiálem byly otisky získané z čerstvé nádorové tkáně. Nádorová tkáň byla odebrána ze dvou oblastí nádoru. Oblast označená jako centrální část nádoru byla získána z geometrického středu nádoru. Jedná se o tkáň nekrotického, cystického a uzlovitého charakteru. Druhý vzorek, odebraný na rozhraní mezi zdravou a patologickou tkání, byl označen jako periferní oblast nádoru. Po rozříznutí vzorku nádoru se řezem vzniklá plocha otiskla několikrát za sebou na podložní sklo. Po zaschnutí preparátů následovala jejich fixace v čistém metanolu po dobu 20 minut při 4 °C a poté byly preparáty přeneseny do roztoku kyseliny octové a metanolu (v poměru 1:3) opět na 20 minut při teplotě 4 °C.

Technika interfázni fluorescenční hybridizace *in situ* (I-FISH) byla prováděna dle firemních protokolů výrobců DNA sond. Počet kopií EGFR genu v buňkách GBM byl studován pomocí dvoubarevné sondy LSI EGFR/CEP7 Dual Color Probe (Abbott-Vysis, Inc.). Pro stanovení počtu chromozomů 7 a 10 v buňkách GBM byly použity α -satelitní centromerické sondy Aquarius CEP7/SpectrumGreen a CEP10/SpectrumRed (Cytocell). Ke stanovení delecce genu p53 byla použita lokusově specifická sonda (LSI p53 SpectrumOrange; Abbott-Vysis Inc.) hybridizující s oblastí 17p13.1 kombinována s centromerickou sondou CEP17 SpectrumGreen (Abbott-Vysis Inc.) hybridizující s α -satelitní DNA chromozomu 17.

Preparáty byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 61 vybaveném CCD kamerou COHU 4910. Fluorescenční signály byly registrovány pomocí počítačového systému pro analýzu obrazu LUCIA G4.82-FISH firmy Laboratory Imaging, Praha, s. r. o. U každého preparátu bylo hodnoceno 100-200 interfázni jader. Hraniční hodnota pozitivit („cutt of level“) byla stanovena na základě vyšetření a statistického zpracování (průměr + 3SD) negativních kontrol (lymfocyty periferní krve) na 3 % buněk pro vyšetření polyzomie chromozomu 7/monozomie chromozomu 10 a na 8 % pro vyšetření delecce genu p53.

Výsledky

Chromozomové abnormality v nádorové tkáni byly studovány u souboru 27 pacientů s histologicky ověřeným GBM (WHO Grade III-IV). V souboru těchto pacientů byl zastoupen jak primární, tak sekundární typ GBM. Jako primární bylo nádorové onemocnění klasifikováno u 24 pacientů (82 %), zatímco u 3 pacientů (10 %) byl nalezen sekundární GBM. Poměr pohlaví pacientů s tímto nádorovým onemocněním byl stanoven na 16:11 s častějším výskytem u mužů (60 %). U mužů byl také častější výskyt primárního glioblastomu, a to ve 14 případech (87 %), zatímco sekundární glioblastom byl diagnostikován u dvou pacientů (13 %). U žen také jednoznačně převažoval výskyt primárního nádoru, a to u 10 případů (91 %). Sekundární glioblastom byl potvrzen u jedné pacientky (9 %). Věk pacientů s diagnostikovaným GBM se pohyboval v rozmezí od 29 do 77 let. Výskyt primárního nádoru byl spojen s mediánem 66 let a sekundárního GBM s mediánem 44 let, kdy bylo toto onemocnění u pacientů diagnostikováno (Tab 1).

Výsledky molekulárně cytogenetických analýz provedené na otiscích nádoru prokázaly, že změny počtu chromozomů 7 a 10 představují nejčastější chromozomové abnormality přítomné v buňkách GBM (Tab. 2).

Monozomie (ztráta) chromozomu 10 byla detekována ve všech

Pacient č.	Pohlaví ^a	Věk ^b	Histologie ^c	Typ nádoru
2	M	69	III. – IV.	primární GBM
3	M	51	III. – IV.	primární GBM
4	F	72	IV.	primární GBM
5	F	56	IV.	primární GBM
6	M	53	IV.	primární GBM
8	M	71	III. – IV.	primární GBM
9	F	59	IV.	primární GBM
10	M	73	III. – IV.	primární GBM
11	F	71	IV.	primární GBM
12	M	65	IV.	primární GBM
14	M	66	IV.	primární GBM
15	M	44	III.-IV.	sekundární GBM
16	M	60	IV.	primární GBM
18	M	72	III. – IV.	primární GBM
19	M	75	IV.	primární GBM
20	F	66	III.-IV.	primární GBM
21	M	29	III. – IV.	sekundární GBM
22	F	77	IV.	primární GBM
23	M	71	IV.	primární GBM
24	F	58	IV.	primární GBM
25	F	69	IV.	primární GBM
27	F	63	IV.	primární GBM
28	F	47	III.-IV.	sekundární GBM
29	M	61	IV.	primární GBM
30	M	67	IV.	primární GBM
31	M	69	IV.	primární GBM
32	F	52	IV.	primární GBM

Tabulka č. 1: Charakteristika vyšetřovaného souboru pacientů s GBM

^aM - muž, F - žena

^bvěk pacienta v době stanovení diagnózy (roky)

^cWHO stupeň nádoru

vyšetřovaných vzorcích nádoru, tj. u 26 pacientů (100 %). U 16 ze 17 pacientů (94 %) byla monozomie chromozomu 10 prokázána současně jak v centrální tak i periferní oblasti nádoru. U jednoho pacienta byla monozomie chromozomu 10 nalezena pouze v centrální části nádoru.

Ve vzorcích nádorové tkáně u 25 z 27 pacientů (93 %) bylo nalezeno 3 až 5 kopií chromozomu 7 (polyzomie chromozomu 7). U 18 pacientů tohoto souboru byl studován výskyt chromozomu 7 v centrální i v periferní oblasti nádoru. Z toho u 17 pacientů (94 %) byl cytogenetický nález, tj. polyzomie chromozomu 7, v obou vyšetřovaných oblastech shodný. Jeden vzorek se vyznačoval polyzomií chromozomu 7 v centrální části nádoru, která však nebyla prokázána ve vzorku z periferní oblasti nádorů.

Ve vzorcích nádoru od 14 pacientů jsme sledovali současný výskyt polyzomie chromozomu 7 a monozomie chromozomu 10 v jednotlivých interfázních jádrech nádorových buněk (Obr. 1). Současný výskyt těchto dvou cytogenetických abnormalit v nádorových buňkách byl prokázán u 10 ze 14 pacientů (71 %).

Společně s polyzomií chromozomu 7 byla stanovována amplifikace genu pro epidermální růstový faktor (EGFR) lokalizovaného v oblasti 7p12. Tato amplifikace byla prokázána celkově u 7 z 27 pacientů (26 %), a to v centrální i periferní oblasti nádoru (Obr. 2).

Delece nádorového supresorového genu p53 byla prokázána pomocí techniky I-FISH u 6 z 27 pacientů (22 %).

Diskuse

Genetická klasifikace astrocytomů vysokého stupně malignity představuje moderní trend diagnostiky biologicky i histologicky heterogenních mozkových nádorů. Molekulárně genetické a cytogenetické studie již objevily řadu genetických abnormalit, které je možno využít k charakterizaci genetických subtypů multifonního glioblastomu a tím k upřesnění jeho budoucího chování a volby terapie. V naší studii jsme se zaměřili na často popisované početní změny chromozomů 7, 10, amplifikaci genu EGFR a deleci genu p53. S ohledem na známé technické obtíže s *in vitro* kultivací solidních nádorů jsme pro tato studia využili techniku interfázni fluorescenční hybridizace *in situ* (I-FISH).

Označení multifonní glioblastom vypovídá o vysoké histomorfologické variabilitě, která odráží genetickou heterogenitu tohoto nádoru. Přítomnost cytogeneticky heterogenních buněčných subpopulací v rámci nádorové tkáně GBM byla popsána např. Jungem aj. (10). V naší práci byly z těchto důvodů odebírány vzorky ze dvou různých oblastí rozšíření nádoru (centrální a periferní) pro jeho lepší genetickou charakterizaci. U více než 90 % analyzovaných vzorků však byly námi pozorované cytogenetické abnormality v centrální i periferní oblasti nádoru shodné.

Souhrnně lze konstatovat, že provedené molekulárně cytogenetické analýzy potvrdily vysokou frekvenci numerických chromozomových aberací, tj. přítomnost většího počtu kopií chromozomu 7 a ztráty celého nebo části chromozomu 10 v nádorovém materiálu. Tyto početní aberace představují chromozomové abnormality typické pro maligní astrocytomy a jsou často popisovány i jinými autory (1,5,6,7,8,9,10,11). Současný výskyt polyzomie 7. a monozomie 10. chromozomu v jednotlivých buňkách jsme zaznamenali u většiny vzorků GBM. Obě tyto aberace odráží celkovou chromozomovou nestabilitu, tj. vysokou incidenci mitotických chyb ve tkáni tumoru (5, 21, 22, 23). V našem souboru pacientů byla monozomie chromozomu 10 často nalezena v kombinaci s dizomií, trizomií nebo polyzomií chromozomu 7. Nejčastěji byla pozorována kombinace monozomie chromozomu 10 s trizomií chromozomu 7 (71 %). Obdobné výsledky aneuploidních počtů uvádí ve své práci i Loeper (7). V současnosti je intenzivně studován význam těchto opakovaně nalézaných genetických abnormalit u GBM z hlediska vzniku a vývoje nádoru, prognostické významnosti a odpovědi na léčbu. V řadě studií je ztráta chromozomu 10 spojována se ztrátou tumor supresorových genů významných z pohledu patogeneze mozkových nádorů. Na chromozomu 10 je lokalizován nádorový supresorový gen PTEN (10q23.3), jehož mutace se vyskytuje u jedné třetiny primárního GBM, zatímco u sekundárního GBM a astrocytomů nižšího stupně je tato mutace přítomna zřídka (8, 24, 25, 26, 27). Dalším nádorovým supresorovým genem nacházejícím se na chromozomu 10 je gen DMBT1 (10q25-26). Ztráta tohoto genu koreluje s iniciací nebo s maligní progresí astrocytomů (28). Ztráta chromozomu 10 byla prokázána jak u nižšího stupně astrocytomů (ve 20%), tak i u astrocytomů nejvyššího stupně (grade IV), avšak zde v podstatně vyšším procentuálním zastoupení (29). Z hlediska prognózy onemocnění je ztráta chromozomu 10 spojena se špatnou prognózou u starších pacientů a s lepší u pacientů mladších 45 let (29). Též na chromozomu 7 jsou lokalizovány geny podílející se na progresi GBM. Jedná se především o gen EGFR a některé další nádorové supresorové geny (13). Sprenger a Arslantas ve svých pracích (9, 30) prokázali, že subtyp GBM charakterizovaný současným výskytem početních chromozomových odchylek +7/-10 je indikátorem horší prognózy vývoje choroby a rezistencí k chemoterapii. Výskyt chromozomu 7 ve vyšším počtu kopií (>5) je rovněž spojen se snížením doby přežití pacientů (31) či radiorezistencí nádorů (12).

Častou genetickou abnormalitou popisovanou u GBM jsou amplifikace genů. Gen EGFR v oblasti 7p12 je zahrnut do kontrolních mechanismů buněčné proliferace, jeho nadměrná exprese podporuje neovaskularizaci, nadměrnou proliferaci

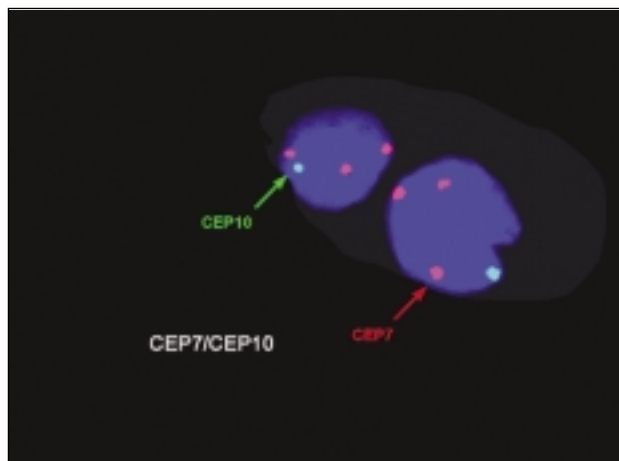
Pacient č.	Část nádoru	Polyzomie chromozomu 7 ^a	Monozomie chromozomu 10 ^b	Polyzomie 7 a monozomie 10 ^c	Amplifikace genu EGFR ^d	Delece genu p53 ^e
2		+	+	x	NA	ND
3		+	+	x	NA	ND
4		+	+	x	NA	D
5		+	+	x	NA	D
6	centrální	+	+	x	NA	D
	periferní	+	+	x	NA	ND
8		+	+	x	A	ND
9		+	+	x	NA	ND
10		+	+	x	NA	ND
11		+	x	x	A	ND
12	centrální	+	+	x	NA	ND
	periferní	+	+	x	NA	ND
14	centrální	+	+	x	NA	D
	periferní	+	+	x	NA	D
15	centrální	+	+	x	A	D
	periferní	+	x	x	A	ND
16	centrální	+	+	x	A	D
	periferní	+	+	x	A	D
18	centrální	+	+	+	NA	ND
	periferní	+	+	+	NA	ND
19	centrální	+	+	+	NA	ND
	periferní	+	+	+	NA	ND
20	centrální	+	+	+	NA	ND
	periferní	+	+	+	NA	ND
21	centrální	-	+	-	NA	ND
	periferní	-	-	-	NA	ND
22	centrální	+	+	-	NA	ND
	periferní	-	+	-	NA	ND
23	centrální	+	+	+	NA	ND
	periferní	+	+	+	NA	ND
24	centrální	+	+	+	NA	ND
	periferní	+	+	+	NA	ND
25	centrální	+	+	-	A	ND
	periferní	+	+	-	A	ND
27	centrální	+	+	+	NA	ND
	periferní	+	+	+	NA	ND
28	centrální	+	+	+	NA	ND
29	centrální	+	+	+	NA	ND
	periferní	+	+	+	NA	ND
30	centrální	+	+	+	NA	ND
	periferní	+	+	+	NA	ND
31	centrální	-	+	-	A	ND
	periferní	-	+	-	A	ND
32	centrální	+	+	+	A	ND
	periferní	+	+	+	A	ND

Tabulka č. 2: Výsledky vyšetření polyzomie chromozomu 7, monozomie chromozomu 10, amplifikace genu EGFR a delece genu p53 pomocí techniky I-FISH u jednotlivých pacientů s GBM

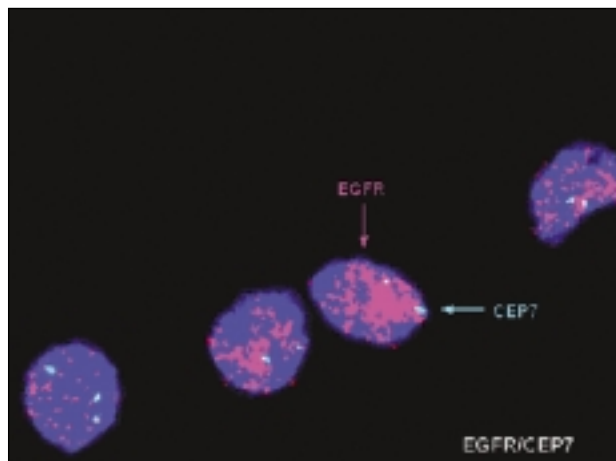
^a pozitivní (+), negativní (-) nález polyzomie chromozomu 7
^b pozitivní (+), negativní (-) nález monozomie chromozomu 10
^c pozitivní (+), negativní (-) současný nález polyzomie chr omozomu 7 a monozomie chromozomu 10 v jednom jádře
^d NA - neamplifikovaný, A - amplifikovaný
^e ND - nedeletovaný, deletovaný
^f výsledky nezjištěny

a rezistenci k signálům buněčné smrti. Amplifikace genu EGFR se vyskytuje u méně než jedné třetiny GBM a častěji bývá zaznamenána u primárního typu tohoto nádorového one-mocnění (24). V našem souboru byla nalezena amplifikace genu EGFR u 26 %, z toho v 88 % u primárního GBM. Li-terární údaje prokazují, že společně s touto genetickou

abnormalitou se vyskytuje často ztráta chromozomu 10, zatím-co delece p53 pouze zřídka (2, 4). V naší studii byla u všech pacientů s pozitivním výskytem amplifikace EGFR současně nalezena i monozomie chromozomu 10. Současný výskyt amplifikace genu EGFR a delece genu p53 byl detekován u dvou pacientů s GBM.



Obr. 1: Výskyt polyzomie chromozomu 7 (červený signál) a monozomie chromozomu 10 (zelený signál) v buňkách GBM detekovaný pomocí metody I-FISH



Obr. 2: Příklad jádra GBM s amplifikací genu EGFR detekovaného metodou I-FISH: interfázni jádra se zelenými signály pro centromeru chromozomu 7 a mnohonásobnými kopiemi (červené signály) pro gen EGFR

Nadměrná exprese či amplifikace genu EGFR se v posledních letech stala jednou z nejvíce studovaných genetických odchylek souvisejících s vývojem a prognózou GBM. Tato aberace je spojena s glioblastomy vznikajícími *de novo* (29). Amplifikace genu EGFR u starších pacientů s GBM souvisí s lepším přežitím, zatímco u mladších je nepříznivým faktorem a to především ve spojení se standardním vyjádřením genu p53 (2, 32). Nadměrná exprese tohoto genu souvisí také s nízkou odpovědí pacientů s GBM na radiační terapii (33) a zvyšováním malignity tumoru. Proto se v terapii tohoto nádorového onemocnění uvažuje o blokování exprese EGFR pomocí jiných proteinů tvořících s EGFR chimerní protein (34).

Mutace nebo delece nádorových supresorových genů hraje hlavní roli ve vzniku a progresi astrocytomů z nižšího stupně do vyššího (29, 35). Výskyt mutace genu p53 koreluje s velikostí primárního nádoru a proliferací *in vitro*. Tato mutace hraje důležitou roli v progresi, migraci a růstu primárního GBM (36). U 22 % pacientů byly nalezeny klonny buněk s delecí genu p53. Mutace genu p53 se častěji vyskytuje u astrocytomů nižšího stupně a u sekundárního GBM (50 %), na rozdíl od primárního GBM, kde se výskyt této aberace pohybuje v rozmezí 10 - 20 % (4, 8, 24). Delece genu p53 byla v našem souboru detekována u 33 % pacientů se sekundárním a u 20 % s primárním GBM. Výskyt mutace genu p53 koreluje se stupněm malignity astrocytomů (37). Pacienti s mutací genu p53 přžívají téměř dvakrát déle než pacienti bez této mutace (32, 38). Nádor, u něhož se vyskytuje mutace genu p53 je charakteristický svou vnímavostí na radiační terapii (12).

Se stále vzrůstajícím počtem detekovaných cytogenetických abnormalit se v poslední době objevují pokusy o podrobnější genetickou stratifikaci GBM. Na základě výskytu delece genu

p53 a amplifikace genu EGFR lze rozdělit pacienty s GBM do 4 subtypů (39). V našem souboru byla u 5 pacientů nalezena amplifikace genu EGFR současně se standardním vyjádřením genu p53 (1. skupina); 4 pacienty charakterizovala delece genu p53, ale ne amplifikace genu EGFR (2. skupina); v 16 případech nebyla přítomna ani jedna z těchto chromozomových aberací (3. skupina); obě abnormality byly přítomny u 2 pacientů (4. skupina). Tyto výsledky potvrzují genetickou heterogenitu GBM, nicméně teprve dlouhodobější studia mohou potvrdit, zda tyto genetické abnormality charakterizují podskupiny nádoru se zásadně odlišnou biologickou povahou a rozdílnou prognózou. Shrnutí těchto poznatků bude součástí následujících analýz.

Závěr

Naše výsledky potvrzují, že GBM je histologicky a biologicky heterogenní nádor, který je charakterizován výskytem specifických početních (monozomie chromozomu 10, polyzomie chromozomu 7) a strukturních (amplifikace genu EGFR, delece genu p53) chromozomových abnormalit. Tyto chromozomové změny lze využít jako charakteristické genetické markery pro diagnostické účely, prognózu onemocnění a pro podrobnější genetickou subklasifikaci GBM, která může v budoucnu ovlivnit i terapii tohoto onemocnění.

Práce byla podpořena projektem COST B19 „Gene Diagnostic and Therapy of Multiform Glioblastoma“ a grantem MSM0021622415 „Molekulární podstata buněčných a tkáňových regulací“

Došlo: 20. 6. 2005

Přijato: 28. 11. 2005

Literatura

1. Mao, X., Hamouni, R.A. Molecular and cytogenetic analysis of glioblastoma multiforme: Cancer Genetics and Cytogenetics, 2000, s. 87-92.
2. Batchelor, T.T., Bebetky, R.A., Esposito, J.M., et. al.: Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma, 2004, 10, s. 228-233.
3. The Medical Research Council Brain Tumor Working Party: Randomized trial of procarbazine, lomustine and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial, J. Clin. Oncol., 2001, 19, s. 509-518
4. Bruce, J.: Glioblastoma multiforme, eMedicine Journal, 2001, 2, posting date. [Online]. [March 8, 2002, last date accessed].
5. Amalfitano, G., Chatek, M., Paquis, P., Michiels, J.F.: Fluorescence

in situ hybridization study of chromosomes 7, 10, X and Y in primary and secondary glioblastomas, Cancer Genet Cytogenet, 2000, 116, s. 6-9.

6. Gayatri, M., Bollen, A.W., Kim, D., et. al.: Genetic Analysis of Glioblastoma Multiforme provides Evidence for Subgroups Within the Grade, Genes Chromosome Cancer, 1998, 21, s. 195-206.
7. Loeper, S., Romeike, B.M., Heckman, N., et. al.: Frequent mitotic errors in tumor cell of genetically micro- heterogeneous glioblastomas, Cytogenet Cell Genet, 2001, 94, s. 1-8.
8. Put-Ti-Noi, S., Petmitr, S., Chanyavanich, V., et. al.: Chromosome 10 and 17 deletions and p53 gene mutations in Thai patients with astrocytomas, Oncol Rep., 2004, 11(1), s. 207-211.
9. Arslantas, A., Hrtan, S., Oner, U., et. al.: The importance of genomic copy

- number changes in the prognosis of glioblastoma multiforme, *Neurosurg Rev.*, 2004, 27(1), s. 58-64.
10. Jung, V., Romeike, B.F.M., Wolfram, H., et. al.: Evidence of Focal Microheterogeneity in Glioblastoma Multiforme by Area-Specific CGH on Microdissected Tumor Cells, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 1999, 9, s. 993-999.
 11. Wiltshire, R.N., Rasheed, B.K.A., Friedman, A.H.F., Bigner, S.H. : Comparative genetic patterns of glioblastoma multiforme: Potential diagnostic tool for tumor classification, *Neuro-Oncology*, 2000, 2, s. 164-173.
 12. Huhn, S.L., Mohapatra, G., Bollen, A., et. al. : Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme by comparative genomic hybridization: Correlation with radiation treatment outcome, *Clinical Cancer Research*, 1999, 5, s. 1435-1443.
 13. Mohapatra, G., Bolen, A.W., Kim, D.H., et. al.: Genetic Analysis of Glioblastoma Multiforme Provides Evidence for Subgroups Within the Grade, *Genes Chromosome Cancer*, 1998, 21, s. 195-206.
 14. Dichamp, C., Taillibert, S., Aguirre-Cruz, L., et. al.: Loss of 14q chromosome in oligodendroglial and astrocytic tumors, *J Neurooncol.*, 2004, 67(3), s. 281-285.
 15. Zainuddin, N., Jaafar, H., Isa, M.N., Abdullah, J.M.: Loss of heterozygosity on chromosomes 10q, 9p, 17p and 13q in malays with malignant glioma, *Neurol Res.*, 2004, 26(1), s. 88-92.
 16. Stark, A.M., Witzel, P., Strege, R.J., et. al.: p53, mdm2, EGFR and msh2 expression in paired initial and recurrent glioblastoma multiforme, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2003, 74(6), s. 779-783.
 17. Hui, A.B., Lo K.W., Yin, X.L., et. al. : Detection of multiple gene amplification in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization, *Lab Invest*, 2001, 81(5), s. 717-723.
 18. Biernat, W., Huang, H., Yokoo, H., et. al.: Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol.*, 2004, 14(2), s. 131-136.
 19. Sauter, G., Maeda, T., Walkman, F.M., et. al.: Patterns of epidermal growth factor receptor amplification in malignant gliomas. *Am J Pathol.*, 1996, 148, s. 1047-1053.
 20. Watanabe, K., Tachibana, O., Saita, K., et. al.: Overexpression of the EGFR receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.*, 1996, 5, s. 217-223.
 21. Bigner, S.H., Mark, J., Bullard, D.E., et. al.: Chromosomal evolution in malignant human gliomas starts with specific and usually numerical deviations. *Cancer Genet Cytogenet.*, 1986, 22, s. 121-135.
 22. Henn, H., Blin, N., Zang, K.D. Polysomy of chromosome 7 is correlated with overexpression of the erbB oncogene in human glioblastoma cell lines. *Hum Genet*, 1986, 74: 104-106.
 23. Thiel, G., Losanova, T., Kintzel, D., et. al. Karyotypes in 90 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet.*, 1992, 58:109-120.
 24. Hilton, D.A., Melling, C. Genetic markers in the assessment of intrinsic brain tumours. *Current Diagnostic Pathology*, 2004, 10:38-92
 25. Fujisawa, H., Reis, R.M., Nakamura, M., Colella, S.: Loss of Heterozygosity on Chromosome 10 Is More Extensive in Primary (De Novo) Than in Secondary Glioblastomas. *Laboratory investigation*, 2000, 80(1), s. 65-72
 26. Kato, H., Kato, S., Kumabe, T., Sonoda, Y. : Functional Evaluation of p53 and PTEN Gene Mutations in Gliomas. *Clinical Cancer Research*, 2000, 6, s. 3937-3943.
 27. Smith, S.J., Tachibana, I., Passe, S.M., Huntley, B.K.: PTEN Mutation, EGFR Amplification, and Outcome in Patients With Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001, 93, s. 1246-1256.
 28. Wessels, P.H., Twijnstra, A., Kubat, B., et. al.: 10q25.3 (DMBT1) copy number changes in astrocytoma grades II and IV. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004, 39(1), s. 22-28.
 29. Balesaria, S., Brock, C., Bower, M., Clark, J.: Loss of chromosome 10 is an independent prognostic factor in high-grade gliomas. *British Journal of Cancer*, 1999, 81(8), s. 1371-1377.
 30. Sprenger, S., Schuurung, J., Wesseling, P., et. al.: Clinical implications of high grade gliomas into 4 groups based on CGH analysis.
 31. Nishizaki, T., Harada, K., Kubota, H., et. al.: Chromosome instability in malignant astrocytic tumors detected by fluorescence in situ hybridization. *J Neurooncol.*, 2002, 56(2), s. 159-165.
 32. Simmons, M.L., Lamborn, K.R., Takahashi, M., et. al.: Analysis of Complex Relationships between Age, p53, Epidermal Growth Factor Receptor, and Survival in Glioblastoma Patients. *Cancer Research.*, 2001, 61, s. 1122-1128.
 33. Barker, F.G., Simmons, M.L., Chang, S.M., et. al.: EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 51(2), s. 410-418.
 34. Liu, K.J., Chen, C.T., Hu, W.S., et. al.: Expression of cytoplasmic-domain substituted epidermal growth factor receptor inhibits tumorigenicity of EGFR-overexpressed human glioblastoma multiforme. *Int J Oncol.*, 2004, 24(3), s. 581-590.
 35. Wang, T.J., Huang, M.S., Hong, C.Y., et. al.: Comparisons of tumor suppressor p53, p21, and p16 gene therapy effects on glioblastoma tumorigenicity in situ. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2001, 287(1), s. 173-80.
 36. Krex, D., Mohr, B., Appelt, H., et. al.: Genetic analysis of a multifocal glioblastoma multiforme: a suitable tool to gain new aspect in glioma development. *Neurosurgery*, 2003, 53(6), s. 1377-84.
 37. Ranuncolo, S.M., Varela, M., Morandi, A., et. al.: Prognostic Value of Mdm2, p53 and p16 in Patients with Astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 2004, s. 113-121.
 38. van Meyel, D.J., Ramsay, D.A., Casson, A.G., et. al.: p53 mutation, expression, and DNA ploidy in evolving gliomas: evidence for two pathways of progression. *J Natl Cancer Inst.*, 1994, 86(13), s. 1011-1017.
 39. Lopez-Gines, C., Cerda-Nicolas, M., Gil-Benso, R., et. al.: Characterization by FISH and molecular studies of different subtypes of glioblastoma multiforme.

Seznam zkratk

DMBT1 gen deletovaný v maligním nádoru mozku
 EGFR receptor pro epidermální růstový faktor
 GBM multiformní glioblastom
 I-FISH interfázni fluorescenční in situ hybridizace
 LSI lokusově specifická sonda
 PTEN gen kódující tyrozin fosfatázu