

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE NÁDORŮ ZE SKUPINY EWINGOVA SARKOMU

MOLECULAR BIOLOGY OF EWING'S FAMILY OF TUMORS

T. ECKSCHLAGER¹, A. VÍCHA¹, V. ŠMELHAUS¹, P. KAVAN¹, M. CHÁNOVÁ¹, J. KOUTECKÝ¹, R. KODET², J. SOUKUP², R. NAGY²

¹KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGIE FN MOTOL A 2. LÉKAŘSKÉ FAKULTY UK, PRAHA

²PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV 2. LÉKAŘSKÉ FAKULTY UK, PRAHA

Souhrn: Na modelu nádorů ze skupiny Ewingova sarkomu (ES) demonstrujeme význam specifických chromozomálních abe-
rací pro vznik nádoru, možnosti jejich průkazu a význam jejich vyšetření pro diferenciální diagnostiku, určování prognózy
a detekci minimální zbytkové choroby. Pro ES jsou typické translokace t(11;22), a t(21;22), ojediněle jsou popisovány t(7;22),
t(17;22) a komplexní translokace. Předpokládá se, že fúzní protein podmíněný těmito translokacemi, kde se spojí část genu
EWS s částí FL-1, ERG, ETV-1 nebo ELAF, se významně podílí na vzniku těchto nádorů. Kromě výše uvedených translo-
kací se mohou u ES vyskytovat sekundární chromozomální aberace. Dále je u těchto nádorů nacházena zvýšená exprese pro-
duktů onkogenů (onkoproteinů) c-myc, c-myb a c-mil/c-raf a bývá amplifikován gen c-myc.

Klíčová slova: nádory skupiny Ewingova sarkomu - Ewingův sarkom, periferní primitivní neuroektodermální nádor /PNET/,
translokace t(11;22), t(21;22), t(7;22) a t(17;22); minimální zbytková choroba, metody detekce chromozomálních abe-
rací.

Summary: The authors demonstrate significance of specific chromosomal aberrations for oncogenesis, differential diagnosis,
evaluation of prognosis and detection of minimal residual disease in the Ewing family of tumors (ES). For ES typical
translocations are t(11;22), and t(21;22), infrequently are described t(7;22), t(17;22) and complex translocations. It is assumed
that a fusion protein caused by one of those translocations, in which are connected parts of gene EWS and FL-1, ERG, ETV-1
or ELAF, give rise to this tumor. In addition there, are described some secondary chromosomal aberrations. Increased
expression of products of some oncogenes (oncoproteins) c-myc, c-myb and c-mil/c-raf and amplification of c-myc is found
in this cancer.

Key words: the Ewing family of tumors- Ewing's sarcoma, peripheral primitive neuroectodermal tumor /PNET/, translocati-
ons t(11;22), t(21;22), t(7;22), and t(17;22), minimal residual disease, methods for detection of chromosomal aberrations.

K nádorům skupiny Ewingova sarkomu /dále jen **Ewingovy sarkomy** - ES/ patří v dnešním pojetí nejen vlastní („původní“) Ewingův sarkom, ale také periferní primitivní neuroektodermální nádor /PPNET/, zkráceně PNET/. Mezi maligními kostními nádory dětí a mladistvých jsou nádory této skupiny v pořadí na druhém místě, mohou ovšem vycházet i z měkkých tkání (nádory extraoseální). Vyskytují se zřídka u osob mladších pěti a starších třiceti let, maximum výskytu je mezi desátým a patnáctým rokem věku. Poměr mužů : žen je 1,5 : 1. Převaha chlapců, která není vyjádřena u menších dětí, stoupá s věkem (1). Pro vznik tohoto nádoru nebyl prokázán žádný rizikový faktor (2).

Na klinice dětské onkologie jsme v období let 1978–1995 ošetřovali 2623 dětí s maligními nádory, z nich 116 této skupiny (4,4 %). Kostních Ewingových sarkomů v užším slova smyslu bylo 66,5 %, extraoseálních 13 %, PNETů 20,5 % z toho je 8,5 % kostních a 12 % měkkých tkání(3).

Současné léčebné postupy u ES využívají kombinované přístupy-operace, chemoterapie, radioterapie a u nejrizikovějších pacientů v indikovaných případech i megachemoterapie s následnou transplantací hematopoetických progenitorových buněk. Třileté přežití se pohybuje u dětí a mladistvých s ES mezi 60–70 %, u generalizovaných je však pouze 30 % (1, 3, 4, 5). Prognóza je ovlivněna nejen rozsahem a lokalizací nádoru, ale i molekulární variabilitou tohoto nádoru, kterou zmíníme dále.

O histogenezi Ewingových sarkomů se vedly dlouho spory. V současnosti převládá názor, který předpokládá jejich původ v cholinergních buňkách parasymptiku, které jsou rozšířeny po celém těle. Hlavním důkazem jeho histogeneze v parasymptiku je průkaz cholecystokininu v buňkách ES a studie

in vitro (4, 5). V experimentech in vitro cyklický AMP, NGF (nerve growth factor) nebo forbol-myristát acetát indukují v buňkách ES tvorbu neurofilament. ES je považován za nádor z nediferencovaných buněk a PNET za formu diferencovanější (1, 3, 4, 5).

Ewingovy sarkomy se vyznačují specifickými chromozomálními aberacemi postihujícími 22. chromozom- t(11;22) (q24;q12) a méně často t(21;22) (q22;q12), výjimečně byly popsány t(7;22) (q22;q12), t(17;22) (q12;q12) nebo komplexní translokace postihující 11. a 22. chromozom (1, 4, 5). Pacienti mají zpravidla normální konstituční karyotyp a výše uvedené translokace se nacházejí pouze v nádorových buňkách. U zdravých osob může být nalezena konstituční translokace t(11;22), která je však odlišná od translokace typické pro ES. Tato konstituční translokace je zpravidla asymptomatická a není provázena zvýšeným rizikem vzniku ES ani jiných nádorů (6).

Nejčastější reciproční translokaci t(11;22) (q24;q12) se daří prokázat standardními cytogenetickými metodami u více jak 80 % ES a při použití metod molekulární biologie ve více než 90 % (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Přestavba postihuje gen EWS na 22. chromozomu a gen FLI-1 na 11. chromozomu. Gen FLI-1 kóduje aktivátor transkripce z rodiny ETS (erytroblastomatos-
is virus transformující sekvence), který se přímo váže na DNA. Rodina ETS genů kóduje proteiny, které obsahují na DNA se vážící doménu- ETS doménu. ETS proteiny, které se vyskytují u všech živočichů, se dělí na různé podrodiny viz tabulka.

Fúzní proteiny obsahují ETS doménu se uplatňují nejen u ES, ale i u chronické myeloidní leukémie t(16;21) gen ERG a t(12;22) gen TEL, u akutní myeloidní leukémie t(5;12) gen

Tabulka.
Přehled genů ETS rodiny. Podtržené geny se podílejí na vzniku nádorů.

Podrodina	Geny
ETS	<u>ETS1</u> , <u>ETS 2</u>
ERG	ERG, <u>FLI-1</u> , FEV
ELG	GABP α
ETS4	<u>TEL</u>
PEA3	<u>EIAF</u> , <u>ERM</u> , <u>ETV1</u> , <u>ER81</u>
TCFs	ELK-1, Sap1a, NET/ERP/Sap2
ELF	ELF1, NERF1b, MEF
SPI	PU1, SPI-B
ERF	ERF, PE-1
ESX	ESX/ESE-1

TEL, u akutní lymfoblastické leukémie z B prekurzorů t(9;12) gen TEL a u karcinomu prsu (zvýšená exprese proteinů z rodiny PEA3). Předpokládá se, že ETS proteiny jsou transkripční faktory a slouží jako vazebné místo proteinu Ras. Tyto proteiny se mohou rovněž uplatňovat při invazivitě a metastázování (souhrnně o genech ETS 10).

O funkci genu EWS je známo pouze to, že jeho produkt obsahuje oblast s vazebnou afinitou k RNA. Fúze genu EWS s jinými geny se uplatňuje i u některých dalších nádorů: u sarkomu z jasných buněk translokace t(12;22), při níž vzniká fúze ATF1 s EWS, u desmoplastického nádoru břišní dutiny z malých kulatých buněk t(11;22), při které s EWS fúzuje gen WT1. Tato translokace tedy není totožná s translokací u ES, i když postihuje stejné chromozomy. U extraskeletálního myxoidního chondrosarkomu byla prokázána t(9;22) fúze TEL s EWS (10, 12, 13, 14). Delece v oblasti 22q11,3-q12 se prokazuje z neurinomu a v oblasti 22q11,2-q12 u menigeomů (15). Zda se tyto hypotetické antionkegony lokalizované na 22. chromozomu uplatňují i u ES, nebo se jedná o pouhou koincidenci, není dosud jasné.

Fúzní gen na derivovaném 22. chromozomu je složen z 5' sekvencí genu EWS a z 3' sekvencí genu FLI-1. Produkt tohoto fúzního genu, kde je aminoterminální část EWS fúzována s ETS doménou genu FL-1, si podržel schopnost vazby na DNA stejně jako produkt normálního genu FLI-1. Terminální doména EWS, která v tomto chimerickém proteinu způsobuje jeho vysoký aktivační potenciál, si zachovala původní schopnost vazby na RNA. Fúzní gen je regulován promotorem genu EWS (5, 16). K zajištění schopnosti vyvolat maligní transformaci je v tomto fúzním genu nezbytná jak 5' oblast genu EWS, tak 3' oblast genu FLI-1-ETS domény (10, 16). Naproti tomu derivovaný 11. chromozom je u části Ewingových sarkomů sekundárně ztracen a na vzniku nádorů se s největší pravděpodobností neuplatňuje.

Dalšími, u Ewingových sarkomů popisovanými, translokacemi jsou t(21;22)(q22;q12) a výjimečně t(7;22)(p22;q12) nebo t(17;22)(q12;q12). U t(21;22) fúzuje s genem EWS jiný gen z rodiny ETS - ERG na 21. chromozomu (5, 18). Tento fúzní gen vykazuje velkou shodu s fúzním genem EWS-FLI-1, kdy ETS doména genu ERG je v 98 % shodná s ETS doménou genu FLI-1 (11). U třetí translokace t(7;22) fúzuje EWS s dalším genem z této rodiny ETV-1 (5, 18). U translokace t(17;22), která je rovněž ojediněle popisována u ES, fúzuje gen EWS s genem EIAF, který je rovněž členem rodiny ETS (19, 20). Translokace t(21;22) se vyskytuje asi u 5 % ES, zbylé dvě translokace t(7;22) a t(17;22) byly nalezeny v jednotlivých případech (1, 3, 4, 5, 19). Kromě těchto translokací literatura uvádí i komplexní translokace postihující geny EWS a FLI-1

t(11;14;22) (q24;q11;q12), t(10;11;22) (q11.2;q24;q12), t(11;17;22) (q24;q22;q11), t(11;18;22) (q24;q22;q12) a t(4;11;22) (q21;q24;q12) (souhrnně 20).

Význam fúzních proteinů pro vznik nádorů byl potvrzen i experimentálně. Transfekce fibroblastů v tkáňové kultuře fúzním genem EWS-FLI-1 nebo EWS-ERG vyvolá transformaci buněk a inhibici apoptózy (10, 20).

Kromě uvedených translokací, které jsou primární, se u Ewingových sarkomů vyskytují ještě sekundární chromozomální aberace – trizomie nebo dokonce tetrazomie 8. a 12. chromozomu a translokace t(1;16)(q10-21;q10-13), která často vede k delecí 16q a ke zmnožení kopií 1q(21, 22). Zda se tyto sekundární chromosomální aberace podílejí na vývoji chování Ewingových sarkomů není dosud zcela jasné. Trisomie 8. a 12. chromozomu je prokazována častěji v relapsech než v primárních nádorech (22). In vitro s délkou kultivace stoupá u buněčných linií odvozených od ES výskyt tetrazomie 8. chromozomu. To je vysvětlováno rychlejší proliferací nebo menším zánikem (apoptózou) buněk s tetrazomií. Trizomie 8. chromozomu buněk v tkáňové kultuře růstově nezvýhodňuje (23).

Přesná poloha translokací t(11;22) a t(21;22) je variabilní. Na úrovni DNA se velikost fúzního genu EWS-FL-1 pohybuje v rozsahu 2–40 kilobází, na úrovni RNA mezi 250–600 báze-mi. Zlomová místa u t(11;22) jsou v 7.–10. intronu EWS a 3.–9. intronu FLI-1 (16). Dosud je v literatuře uvedeno více než 15 fúzních transkriptů. Tyto chimerické geny kódují velmi podobné proteiny (24). Nejčastěji jsou udávány čtyři různé fúzní sekvence (25). Fúzní gen vždy obsahuje 1. až 7. exon EWS a nejméně 9. exon FLI-1 nebo odpovídající části jednoho z genů ERG, ETV-1 či EIAF (1, 26). Zdá se, že přesný typ přestavby t(11;22) určený polohou zlomových míst by mohl mít prognostický význam. U translokací spojujících 1. až 7. exon EWS a 6. až 9. exon FLI-1 (nejčastější tzv. 1. typ) našli rakouští autoři častěji lokalizované nádory postihující končetiny a u translokací v oblasti 7. exonu EWS a 5. exonu FLI-1 (tzv. 2. typ) byly podstatně častější nádory centrální osy, které metastázovaly (26). Příznivější průběh u 1. typu t(11;22) potvrdili rovněž španělští autoři (27). Zdá se, že přesné určení typu translokace t(11;22) bude sloužit jako nezávislý prognostický znak. Podrobnější specifikace zlomových míst u ostatních translokací není dosud známá vzhledem k jejich řídkému výskytu.

Kromě těchto translokací je u Ewingových sarkomů udávána zvýšená exprese produktů onkogenů (tzv. onkoproteinů) c-myc, c-myc a c-mil/c-raf. ES neexprimují c-sis ani c-fes (28, 29). Gen c-myc bývá na rozdíl od genu N-myc amplifikován (30). Tyto nálezy svědčí pro účast dalších kroků na vzniku nebo vývoji ES a potvrzují tak teorii o víceúrovňovém vzniku nádorů. Mutace genu p53 se u Ewingových sarkomů nalézá pouze zřídka a není ve vztahu k oblasti zlomových míst ani k průběhu onemocnění. Zdá se, že mutace jedné alely p53 provázaná delecí druhé alely je spojena s horší prognózou (31). U většiny Ewingových sarkomů jsou na úrovni RNA i proteinů exprimovány nm 23-H1 i nm 23-H2. Tyto proteiny, které jsou povahy NDP-kinázy, mají u řady nádorů protimetastatický efekt (melanom, karcinom prsu, kolorekta, ledviny a j.). Ztráta genu nm 23-H1 nebo nm 23-H2 se u výše uvedených nádorů projevuje zvýšenou tendencí k metastázování. U nádorů dětského věku může být význam těchto proteinů jiný, protože naopak u neuroblastomu je amplifikace a zvýšená exprese nm23-H1 známkou horší prognózy (32).

V současnosti máme k dispozici několik metod k detekci výše uvedených translokací, které mají význam pro klinickou praxi. Základním postupem je standardní cytogenetické vyšetření. Hlavní přednost cytogenetického vyšetření oproti fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) a polymerázové řetězové reakci (PCR) je v tom, že umožňuje zachytit všechny větší chromozomální aberace. Tak lze jedním vyšetřením detekovat například t(11;22), t(21;22), t(7;22), nebo t(17;22), což molekulárně biologické metody neumožňují. Cytogenetické

vyšetření lze při nejistotě zpřesnit pomocí FISH za použití tzv. malovacích sond pro jednotlivé chromozomy. Jedná se o sondy hybridizující s mnohočetnými chromozomálními sekvencemi, kterými lze označit celý chromozom. Tyto sondy, které jsou velmi vhodné zvláště k diagnostice translokací, jsou komerčně dostupné pro všechny chromozomy karyotypu člověka. Tak lze ve sledované mitóze označit celý příslušný chromozom, a pokud je translokován, získáme další světelný signál z jeho translokované části. S výhodou lze použít dvě nebo dokonce tři různobarevně značené sondy (33).

Hlavní nevýhodou cytogenetického vyšetření je technická obtížnost kultivace nádorových buněk zvláště ze solidních nádorů. I na renomovaných pracovištích se nedaří zpravidla získat u více jak 40 % nádorů hodnotitelné mitózy (34). Navíc nemáme při normálním karyotypu jistotu, že hodnocené mitózy pocházejí skutečně z nádorových buněk. Dosud není k dispozici metoda, která by umožnila určit z jaké buňky vyšetřovaná mitóza pochází.

K detekci translokací lze použít i molekulárně biologické metody - FISH a PCR. FISH lze hodnotit jak v mitóze, tak v interfázi. Pokud máme k dispozici dvě různě značené sondy proti oblasti, které se nacházejí na obou chromozomech blízko oblasti zlomu, získáme u normální buňky čtyři signály, vždy po dvou signálech stejné barvy. U buňky s hledanou translokací je místo jedné dvojice fúzní signál, jehož barva odpovídá kombinaci barev obou signálů viz obrázek. Někdy lze jako kontrolu použít dvě sondy lokalizované na stejném chromozomu blízko před zlomovým místem a za ním, které se v interfázi u netranslokovaného chromozomu jeví jako jeden bod a u translokovaného jako body dva. Tímto přístupem lze však prokázat pouze, zda je příslušná část oddělena (deletována nebo translokována) ne však zda a s kterým chromozomem fúzuje. K průkazu t(11;22) u ES byly již připraveny kosmidové sondy (35, 36). Velmi perspektivní metodou k průkazu numerických chromozomálních aberací (chybění nebo zmnožení počtu chromozomů nebo jejich částí) se jeví komparativní genomová hybridizace (CGH) (37).

K dispozici je reversně transkripční PCR (RT PCR) detekující t(11;22)(q24;q12) a t(21;22)(q24;q12) (38, 39). Reversní transkripci je nutné použít vzhledem k variabilitě zlomových míst a k tomu, že oba postižené geny obsahují introny. Velikost produktu vzniklého amplifikací při RT PCR s primery lokalizovanými na 11. a 22. chromozomu umožňuje zjistit, který typ translokace je ve vzorku přítomen (40). RT PCR umožňuje velmi citlivě diagnostikovat přítomnost nádorových buněk již v množství 1 nádorová buňka na 10^3 – 10^4 zdravých buněk. Citlivost průkazu lze ještě o 1–2 řády zvýšit použitím tzv. uhnížděné („nested“) PCR. Jde o PCR reakci z produktu prvního kola PCR s primery, které leží uvnitř tohoto produktu (31). V současnosti byly navrženy primery, které detekují obě nejčastější translokace t(11;22) i t(21;22), protože vycházejí z homologie v ETS doméně. Dalšími RT PCR reakcemi je pak možno určit, o kterou z translokací se jedná (41).

Předností molekulárně biologických metod proti vyšetření cytogenetickému je nesrovnatelně větší citlivost, zvláště u RT PCR, a větší spolehlivost. Odpadá totiž nezbytnost kultivace a záchytu mitóz. Na druhé straně odpoví FISH a PCR pouze na to, zda je hledaná chromozomální aberace přítomna a neodhalí žádnou jinou aberaci. Například výsledek RT PCR s primery k detekci t(11;22) nás neinformuje o t(21;22), t(7;22) nebo t(17;22). Ideální situací je proto kombinace jak vyšetření cytogenetického, tak molekulárně biologického.

Tyto cytogenetické a molekulárně biologické metody zpřesňují diferenciální diagnostiku nádorů dětského věku. Ewingovy sarkomy totiž patří do tak zvané skupiny „nádorů z malých kulatých buněk“. Do této skupiny nádorů zařazujeme ještě neuroblastom, rabdomyosarkom a non-Hodgkinské lymfomy. Přesné odlišení těchto nádorů, které je nezbytné pro výběr správné terapie, je obtížné a někdy dokonce nemožné i pro velmi erudovaného patologa. Morfoligicky jsou nádory z malých kulatých buněk charakterizovány malými hyperchromatickými buňkami s kulatým jádrem, s promínujícím jádérkem a s velmi chudou cytoplazmou. Speciálním barvením lze prokázat u zhruba 90 % ES glykogen. Průkaz glykogenu však není zcela patologomický pro ES, protože byl nalezen i u jiných nádorů z této skupiny (42). Imunohistochemicky lze na buňkách Ewingova sarkomu v užším slova smyslu prokázat vimentin, HBA-71 a MIC2 a u PNETů ještě ostenectin, neurospecifickou enolázu a S-100. Ani průkaz těchto antigenů není zcela jednoznačný v diferenciální diagnostice ES (1). K přesné diagnostice nádorů z této skupiny přispívá kromě vyšetření histologického, ultrastrukturálního, imunohistochemického i průkaz chromozomálních aberací (1, 3, 4, 38, 39, 40).

Další význam molekulárně biologických metod spočívá v přesnějším určení klinického stadia (průkaz malého množství nádorových buněk v kostní dřeni) a při detekci minimální zbytkové choroby. Kolektiv francouzských autorů prokázal, že u pacientů s ES nález buněk se specifickými translokacemi v kostní dřeni je známkou horší prognózy. Naproti tomu průkaz nádorových buněk v periferní krvi nemá jednoznačný vztah k prognóze (43). Význam detekce zbytkové choroby v poslední době ještě vzrostl zavedením megachemoterapie s následnou transplantací hematopoetických buněk. Metodou značení geny bylo prokázáno, že alespoň za část relapsů po megachemoterapii je odpovědný přenos buněk štěpem (44). Proto průkaz „bezpečnosti“ štěpu a jejich čištění ex vivo s následnou kontrolou efektu tohoto „purgingu“ může napomoci ke zlepšení prognózy pacientů s nejrizikovějšími formami ES.

Po dalším prověření se může molekulárně biologické vyšetření, které určí typ a zlomová místa příslušné translokace, uplatnit i při zpřesnění prognózy Ewingova sarkomu. Podle některých literárních údajů se při určení prognózy ES může uplatnit i cytometrická analýza. Pacienti s DNA aneuploidními nádory mají horší prognózu (19). Na našem souboru 13 pacientů s ES, u kterých jsme vyšetřili DNA ploidii před zahájením chemoterapie a radioterapie, jsme výrazně horší přežití

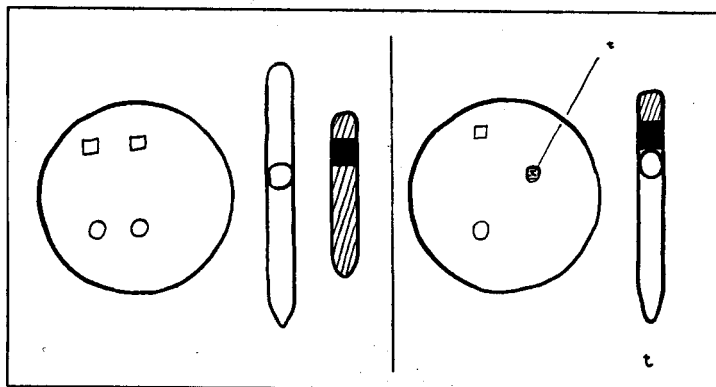


Schéma průkazu translokace metodou FISH při použití dvou sond značených různými fluorochromy – čtvereček a kolečko.

A – normální buňka – dvě dvojice různobarevných signálů
B – buňka s translokací – dva signály různé barvy odpovídající dvěma netranslokovaným chromozomům, třetí signál – t, odpovídající fúznímu genu vzniká spojením obou barev.

u dětí s DNA aneuploidním nádorem nepotvrdili. Tento vztah však sledujeme i nadále a plánujeme jej vyhodnotit u většího souboru pacientů a po delší době sledování.

Na příkladu Ewingova sarkomu jsme se pokusili demonstrovat nejen současné znalosti získané teoretickým výzkumem v oblasti molekulární biologie, ale především význam těchto poznatků pro klinickou praxi a nezbytnost jejich zavádění.

V laboratoři kliniky dětské onkologie 2. lékařské fakulty UK jsme v současné době zahájili program zaměřený na detek-

ci translokací u Ewingových sarkomů metodou nested RT PCR a FISH s cílem zpřesnit diagnostiku, staging a detekci zbytkové choroby. V dilučních testech (nádorové buňky ředěné leukocyty normální krve nebo kostní dřevě) jsme dokázali detekovat jednu nádorovou buňku na 10⁵ buněk normálních.

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR č. 2600-5, 2896-5 a Mf/6-3.

Literatura

1. H. Jurgens, A. Barrett, D. Dockhorn-Dworniczak a W. Winhelman: Ewing's sarcoma. v P. A. Voute, C. Kalifa a A. Barretteds. Cancer in Children. Oxford University Press, Oxford, 1998.
2. J. D. Buckley, T. W. Pendergrass, E. M. Buckley a kol.: Epidemiology of osteosarcoma and Ewing's sarcoma in childhood: A study of 305 cases by the Children's Cancer Group. Cancer, 83, 1440, 1998.
3. J. Koutecký a kol.: Nádorová onemocnění dětí a mladistvých. Karolinum, Praha 1997.
4. E. Grier: The Ewing Family of Tumors. Ped. Clin. N. America, 44, 991, 1997.
5. M. E. Horowitz, M. G. Tsokos, T. F. De Laney: Ewing's Sarcoma. CA, 42, 300, 1992.
6. M. Budarf, B. Sellinger, C. Griffin a B. S. Emanuel: Comparative mapping of the constitutional and tumor-associated 11;22 translocation. Am. J. Hum. Genet., 45, 128, 1989.
7. C. Turc-Carel, A. Aurias, F. Mugneret a kol.: Chromosomes in Ewing's sarcoma. An evolution of 85 cases of remarkable consists of t(11;22)(q24;q12). Cancer Genet. Cytogenet. 32, 229, 1988.
8. J. Whang-Peng, T. J. Tricle, T. Knutsen a kol.: Cytogenetic characterization of selected small round cell tumors of childhood. Cancer Genet. Cytogenet., 21, 195, 1986.
9. O. Delattre, J. Zucman, B. Plougastel a kol.: Cloning of the recurrent t(11;22) translocation of Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma. Proc. Amer. Assoc. Cancer. Res., 3, 604, 1992.
10. J. Dittner a A. Nordheim: ETS transcription factors and human disease. Biochemica Biophysica Acta, 1377, F1, 1988.
11. M. Peter, F. Mugneret, A. Aurias a kol.: An EWS/ERG fusion with a truncated N-terminal domain of EWS in Ewing's tumor. Int. J. Cancer, 67, 1996, 339.
12. J. Zucman, O. Delattre, C. Desmare a kol.: EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;21) translocation in malignant melanoma of soft parts. Nat. Genet., 4:341, 1993.
13. J. Ledonyi, W. Gerald: Fusion of the EWS and WT1 in the desmoplastic small round cell tumor. Canc. Res. 52, 2837, 1994.
14. F. Mertens, N. Mendache, F. Mitelman: Cytogenetic analysis in the examination of solid tumors in children. Ped. Hematol. Oncol., 11:361, 1994.
15. J. A. Rey, M. J. Bello, J. M. de Campo a kol.: Abnormalities of chromosome 22 in Human Brain Tumors Determined by Combined Cytogenetic and Molecular Genetic Approaches. Cancer Genet. Cytogenet., 66:1, 1993.
16. O. Delattre, J. Zucman, T. Melot a kol.: The Ewing family of tumors: A subgroup of small - round - cell tumors defined by specific chimeric transcripts. N. Engl. J. Med., 331, 294, 1994.
17. X. Mao, S. Miesfeld, H. Yang a kol.: The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA Binding Specificities. J. Biol. Chemistry., 269, 199, 18216.
18. P. H. B. Sorensen, S. L. Lessnick, D. Lopez-Terrada a kol.: A second Ewing's sarcoma translocation t(21;22) fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. Nat. Genet., 6, 146, 1994.
19. S. Hon, J. M. Davis, B. S. Braun a kol.: A variant Ewing's sarcoma translocation t(7;22) fuses the gene ETS to the gen ETV-1. Oncogene 10:1229, 1995.
20. M. E. Horowitz, M. M. Malawer, S. Y. Woo a M. J. Hicks: Ewing's sarcoma of bone and soft tissue and the peripheral primitive neuroectodermal tumors. v P. A. Pizzo a D. G. Poplack eds. Principles and Practice of Pediatric Oncology. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, 1977.
21. Y. Kaneko, K. Yoshida, M. Handa a kol.: Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q24) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. Genes Chromosomes Cancer, 15, 115, 1996.
22. D. Maurici, A. Perez-Atayde, H. E. Grier a kol.: Frequency and implication of Chromosome 8 and 11 gains in Ewing sarcoma. Cancer Genet. Cytogenet., 100, 106, 1998.
23. L. Trakhtenbrot, Y. Neumann, M. Mandel a kol.: In vitro proliferative advantage of bone marrow cells with tetrasomy 8 in Ewing sarcoma. Cancer. Genet. Cytogenet., 90, 176, 1996.
24. J. Zucman, T. Melot, C. Desmaza a kol.: Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. EMBO. J., 12, 4481, 1993.
25. M. Giovaninini, J. A. Bigel, M. Serra a kol.: EW-ERG and EWS-FLI-1 fusion transcripts in Ewing's sarcoma and neuroectodermal tumours with variant translocations. J. Clint. Invest., 94, 489, 1994.
26. A. Zoubek, B. Dockhorn Dworniczek, O. Delattre a kol.: Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients. J. Clin. Oncol., 14, 1245, 1996.
27. E. de Alava, A. Kawai, J. H. Healey a kol.: EWS-FLI-1 fusion transcript structure an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. J. Clin. Oncol., 16, 1248, 1998.
28. McKeon, C. J. Thiele, R. A. Ross a kol.: Indistinguishable patterns of protooncogene expression in two distinct but closely related tumors: Ewing's sarcoma and neuroethelioma. Cancer. Res. 48: 4307, 1988.
29. L. R. Donner: Cytogenetics and molecular biology of small round-cell tumors and related neoplasms.-current status. Cancer. Genet. Cytogenet., 64, 1, 1991.
30. C. J. Thiele, C. McKeon, T. J. Triche a kol.: Differential protooncogene expression characterizes histopathologically indistinguishable tumors of the peripheral nervous system. J. Clin. Invest., 80, 804, 1987.
31. R. Hamelin, J. Zucman, T. Melot a kol.: p53 mutations in human tumors with chimeric EWS/FLI-1 genes. Int. J. Cancer., 57, 336, 1994.
32. D. N. T. Aryee, T. Strobel, K. Kos a kol.: High nm 23-H1/NDPK-A expression in Ewing tumors: paradoxical immunohistochemical reactivity and lack of prognostic significance. Int. J. Cancer, 64, 104, 1995.
33. K. Michalová: Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) v klinické cytogenetice. Čas. Lék. Čes., 134, 73, 1995.
34. M. J. Barch: The ACT Cytogenetics Laboratory Manual. Raven Press. New York, 1991.
35. P. Lelleri, G. G. Hermanson, J. H. Enbanks a kol.: Molecular localization of the t(11;22)(q24;q12) translocation of Ewing sarcoma by chromosomal in situ suppression hybridization. Proc. Natl. Assoc. Sci. USA. 88:887, 1991.
36. J. Thorner, J. Squire, S. Chilton-McNeill a kol.: Is the EWS-FLI-1 fusion transcript specific for Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor? Eng. J. Pathol., 148, 1125, 1996.
37. J. Piper, D. Rutovitz, D. Sudar a kol.: Computer image analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry, 19, 10, 1995.
38. Pfeiderer, A. Zoubek, B. Gruber a kol.: Detection of tumour cells in peripheral blood and bone marrow from Ewing tumour patients by RT-PCR. Int. J. Cancer 64, 135, 1995.
39. J. R. Downing, D. R. Head, D. M. Parham a kol.: Detection of the (11;22) (q24;q12) translocation of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor by reverse transcripction polymerase chain reaction. Am. J. Pathol., 143, 1294, 1993.
40. J. R. Downing, A. Khondehor, S. A. Shortleff a kol.: Multiplex RT-PCR assay for differential diagnosis of alveolar rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. Am. J. Pathol., 146, 626, 1995.
41. V. S. Meier, T. Kuhna, G. Jundt, F. Gudat: Molecular diagnosis of Ewing tumors: improved detection of EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric transcripts and rapid determination of exon combinations. Diagn. Mol. Pathol., 7, 29, 1998.
42. D. Schmidt, D. Harm a V. A. Pilon: Small-cell pediatric tumors: histology, immunohistochemistry, and electron microscopy. Clin. Lab. med., 7, 63, 1987.
43. C. Fagnou, J. Michon, M. Peter a kol.: Presence of tumor cells in bone marrow but not in blood is associated with adverse prognosis in patients with Ewing's tumor. J. Clin. Oncol., 16, 1707, 1998.
44. M. K. Brener, D. R. Rill, R. C. Moen: Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. Lancet, 341, 135, 1993.