Molekulárně cytogenetická analýza chromozomových aberací v buňkách nízkostupňových gliomů a její přínos pro klasifikaci nádoru

Molecular Cytogenetic Analysis of Chromosomal Aberrations in Cells of Low Grade Gliomas and Its Contribution for Tumour Classification

Lhotská H.¹, Zemanová Z.¹, Kramář F.², Lizcová L.¹, Svobodová K.¹, Ransdorfová Š.³, Bystřická D.¹, Krejčík Z.³, Hrabal P.², Dohnalová A.⁴, Kaiser M.⁵, Michalová K.¹

¹ Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN v Praze

² Oddělení neurochirurgie, 1. LF UK a ÚVN Praha

³ Oddělení cytogenetiky, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

⁴ Fyziologický ústav, 1. LF UK v Praze

⁵ Neurochirurgie, Krajská nemocnice Liberec

Souhrn

Východiska: Nízkostupňové gliomy představují heterogenní skupinu primárních mozkových nádorů. Jejich současná diagnostika je založena hlavně na histologické klasifikaci. S rozvojem molekulární cytogenetiky však bylo objeveno několik markerů umožňujících lépe definovat daný gliomový subtyp. Cílem studie bylo sledovat získané chromozomové aberace v buňkách nízkostupňových gliomů molekulárně cytogenetickými metodami a hledat nové genomové změny, které by mohly souviset s progresí nádoru. **Soubor pacientů a metody:** Technikami interfázni fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH) a single nucleotide polymorphism (SNP) array jsme vyšetřili vzorky od 41 pacientů s histologicky potvrzenými nízkostupňovými gliomy (19 žen a 22 mužů, medián věku 42 let). **Výsledky:** Kromě nejčastější známé aberace, tj. kombinované delecí krátkých ramen chromozomu 1 a dlouhých ramen chromozomu 19 (u 81,25 % pacientů), jsme u pacientů s oligodendrogliomy detekovali další rekurentní aberace – delecí krátkých a/nebo dlouhých ramen chromozomu 4 (25 % nemocných), delecí krátkých ramen chromozomu 9 (18,75 % pacientů), delecí dlouhých ramen chromozomu 13 a monozomii chromozomu 18 (18,75 % pacientů). U pacientů s astrocytomy jsme často pozorovali delecí krátkých ramen chromozomu 1 (24 % nemocných), amplifikaci dlouhých ramen chromozomu 7 (16 % nemocných), delecí dlouhých ramen chromozomu 13 (20 % nemocných), segmentální uniparentální disomii (UPD) na krátkých ramenech chromozomu 17 (60 % pacientů) a delecí dlouhých ramen chromozomu 19 (28 % nemocných). U jednoho pacienta jsme pozorovali tzv. chromothripsis chromozomu 10. **Závěr:** V pilotní studii jsme kombinací metod I-FISH a SNP array detekovali nejen známé chromozomové změny, které jsou typické pro jednotlivé subtypy nádorů, ale také nové nebo méně časté rekurentní aberace. Jejich úlohu v progresi nádorových buněk, stejně jako jejich význam z hlediska klasifikace nízkostupňových gliomů však bude nezbytné ověřit v dalších studiích na větších souborech nemocných.

Klíčová slova

oligodendrogliom – astrocytom – SNP array – interfázni FISH – gliom

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR č. NT/13212-4, PRVOUK-P27/LF1/1 a RVO-VFN64165.

This work was supported by grants of Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health No. NT/13212-4, PRVOUK-P27/LF1/1 a RVO-VFN64165.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

Mgr. Halka Lhotská

Centrum nádorové cytogenetiky
Ústav lékařské biochemie
a laboratorní diagnostiky
1. LF UK a VFN
U Nemocnice 2
128 08 Praha 2
e-mail: halka.buryova@vfn.cz

Obdrženo/Submitted: 5. 11. 2013

Přijato/Accepted: 29. 1. 2014

Summary

Background: Low-grade gliomas represent a heterogeneous group of primary brain malignancies. The current diagnostics of these tumors rely strongly on histological classification. With the development of molecular cytogenetic methods several genetic markers were described, contributing to a better distinction of glial subtypes. The aim of this study was to assess the frequency of acquired chromosomal aberrations in low-grade gliomas and to search for new genomic changes associated with higher risk of tumor progression. **Patients and Methods:** We analysed biopsy specimens from 41 patients with histological diagnosis of low-grade glioma using interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH) and single nucleotide polymorphism (SNP) array techniques (19 females and 22 males, medium age 42 years). **Results:** Besides notorious and most frequent finding of combined deletion of 1p/19q (81.25% patients) several other recurrent aberrations were described in patients with oligodendrogliomas: deletions of p and q arms of chromosome 4 (25% patients), deletions of the short arms of chromosome 9 (18.75% patients), deletions of the long arms of chromosome 13 and monosomy of chromosome 18 (18.75% patients). In biopsy specimens from patients with astrocytomas, we often observed deletion of 1p (24% patients), amplification of the long arms of chromosome 7 (16% patients), deletion of the long arm of chromosome 13 (20% patients), segmental uniparental disomy (UPD) of the short arms of chromosome 17 (60% patients) and deletion of the long arms of chromosome 19 (28% patients). In one patient we detected a shattered chromosome 10 resulting from chromothripsis. **Conclusion:** Using a combination of I-FISH and SNP array, we detected not only known chromosomal changes but also new or less frequent recurrent aberrations. Their role in cancer-cell progression and their impact on low-grade gliomas classification remains to be elucidated in a larger cohort of patients.

Key words

oligodendroglioma – astrocytoma – SNP array – interphase FISH – glioma

Východiska

Mezi nejčastější primární nádory centrální nervové soustavy (CNS) patří mozkové gliomy. Jedná se o heterogenní skupinu maligních nádorů skládající se z různých histologických subtypů. V současné době jsou gliomy děleny na základě klasifikace Světové zdravotnické organizace (World Health Organization – WHO) z roku 2007 [1]. Nejčastější jsou astrocytomy, oligodendrogliomy a smíšené oligoastrocytomy. Jednotlivé subtypy lze pak rozdělit do čtyř stupňů podle stupně malignity, a to na tzv. nízkostupňové gliomy (grade I a II, low-grade) a gliomy vyšších stupňů (grade III a IV, high-grade). Histologický subtyp a stupeň gliomu jsou spojeny s maligním potenciálem, odpovídá na léčbu a přežití pacienta [2].

Astrocytomy jsou v rámci primárních mozkových nádorů nejčastěji se vyskytujícím typem gliomu s roční incidencí 4,8 případu na 100 000 obyvatel. Pravděpodobnost 5letého přežití nemocných s tímto subtypem mozkového nádoru činí pouze 15 %. Incidence nízkostupňových astrocytomů je 1,2 případu/100 000 obyvatel, zde přežije prvních pět let od diagnózy až 43 % pacientů [3]. V případě nízkostupňových oligodendrogliomů je roční výskyt 0,3 případu a tito pacienti mají 65% pravděpodobnost 5letého přežití [3].

Léčba mozkových gliomů je problematická, protože jejich difúzní charak-

ter neumožňuje úplnou chirurgickou resekci. Výjimku z tohoto pravidla tvoří pilocytický astrocytom (pilocytic astrocytoma, WHO grade I) vyskytující se převážně u pediatrických pacientů. Radikální resekce znamená v tomto případě vyléčení nemocného. Z důvodu neúplné, z biologického hlediska nemožné resekce pak dochází u ostatních gliomů k relapsu onemocnění a v případě gliomů nižších stupňů (grade II) také k malignímu zvratu [4]. Určitou představu o charakteru nádoru dává vyšetření magnetickou rezonancí s kontrastní látkou a magnetická rezonanční spektroskopie, které umožňují s vysokou senzitivitou určit, zda se jedná o nízkostupňový či vysokostupňový gliom [5]. Nicméně současná klasifikace gliomů je stále založena na histopatologických rysech nádoru, jimiž je např. jaderný pleomorfismus, zvýšená buněčnost a mitotická aktivita, proliferace endoteliálních buněk a nekróza. Takovéto rozlišení jednotlivých subtypů je však často subjektivní, a to i za použití specifických imunohistochemických markerů. Z tohoto důvodu byly gliomy podrobeny molekulárně genetické a cytogenetické analýze, která umožnila definovat v genomu několik oblastí asociovaných s určitým subtypem gliálního nádoru. Velmi významným nálezem u difúzních astrocytomů je např. specifická mutace *IDH1* R132H, resp. *IDH2* R172M. V sou-

časné době je tato mutace považována za první krok v tumorigenezi většiny difúzních astrocytomů (diffuse astrocytoma) [6]. K nejčastěji popisovaným aberacím patří amplifikace dlouhých ramen chromozomu 7 vyskytující se u 55 % difúzních astrocytomů (WHO grade II) [7,8], dále amplifikace krátkých ramen chromozomu 7, spojená s amplifikací genu *EGFR*, která je charakteristickým nálezem u gliomů vyšších stupňů (anaplastický astrocytom, WHO grade III a glioblastom, WHO grade IV). Kombinovaná delecí v oblasti 1p a 19q je pak spojena s oligodendrogliálním subtypem nádorů a bývá nalézána až v 90 % nízkostupňových oligodendrogliomů (WHO grade II) a v 70 % anaplastických oligodendrogliomů (WHO grade III) [1,9,10]. Tato aberace je obvykle důsledkem nebalancované translokace mezi chromozomy 1 a 19, při které vzniká derivovaný chromozom der(1;19) (q10;p10) [11,12]. Podle některých autorů znamená přítomnost kombinované delecí 1p/19q pro pacienta dobrou prognózu zejména díky pomalejšímu růstu nádoru a lepší odpovědi na radio- a chemoterapii [13–15]. Další často se vyskytující aberací jsou mutace nebo delecí genu *TP53* (lokalizovaného v oblasti 17p13.1) a s tím související segmentální uniparentální dizomie (uniparental disomy – UPD) na krátkých ramenech chromozomu 17 [2]. Pro gliomy vyšších

Tab. 1. Přehled DNA sond používaných u jednotlivých subtypů k záchytu nejčastějších chromozomových aberací.

Druh vyšetřované tkáně	Chromozomová aberace	DNA sonda	Značení
oligodendrogliomy	delece genu <i>CDKN2A</i> (p16)	LSI p16 (9p21)/CEP 9	SO/SG
	delece oblasti 19q13.3	LSI 19q13/LSI 19p13	
	delece oblasti 1p36	LSI 1p36/LSI 1q25	
astrocytomy	delece genu <i>RB1</i>	LSI <i>RB1</i> (13q14)/LSI 13qter	
	delece genu <i>TP53</i>	LSI <i>TP53</i> (17p13.1)/CEP 17	
	delece genu <i>CDKN2A</i> (p16)	LSI p16 (9p21)/CEP 9	

stupňů je typická přítomnost monozomie chromozomu 10, delece *RB1* genu (v oblasti 13q14), delece genu *PTEN* (v oblasti 10q23.3), delece genu *CDKN2A* (p16, v oblasti 9p21) atd. [16–20].

Navzdory velkému množství studií, které se zabývají specifickými markery a chromozomovými aberacemi typickými pro toto nádorové onemocnění, charakteristické změny umožňující definovat jednotlivé subtypy nízkostupňových gliomů již při úvodní diagnóze doposud zůstávají nepopsané. V naší pilotní studii jsme provedli detailní analýzu buněk mozkových nádorů získaných od 41 pacientů s histologicky potvrzenými nízkostupňovými gliomy metodami molekulární cytogenetiky, které umožňují nejen cílenou detekci známých chromozomových aberací, ale i celogenomovou analýzu nádorových buněk. Naším hlavním cílem bylo získat co nejširší přehled o získaných chromozomových změnách vyskytujících se u nízkostupňových astrocytomů a oligodendrogliomů a případně hledat nové aberace, které by mohly být spojeny se zvýšeným rizikem transformace do nádorů vyšších stupňů.

Soubor pacientů a metody

Vyšetřili jsme vzorky nádorové tkáně získané od 41 nemocných s histologicky prokázanými nízkostupňovými gliomy (WHO grade II), kteří byli v letech 2005–2013 operováni na Neurochirurgické klinice 1. LF UK a ÚVN v Praze a na Neurochirurgickém oddělení KN v Liberci. Všem pacientům byl předložen formulář pro informovaný souhlas a do projektu byli zařazeni jen ti nemocní, kteří s navrženým léčebným postupem a odběrem vzorků pro výzkumné účely souhlasili.

Odběr a zpracování vzorků

Nádorová tkáň byla odebírána během neurochirurgických operací, a její odběr tak pro pacienta nepředstavoval nadbytečnou zátěž. Čerstvě odebraná tkáň byla přenesena do odběrového média (PBS, heparin), ve kterém byla homogenizována a rozdělena na dvě části. První část byla zpracována standardním cytogenetickým postupem (hypotonie, fixace) a z těchto fixovaných buněčných suspenzí byly připraveny mikroskopické preparáty pro I-FISH. Druhá část homogenizátu byla centrifugována (15 000 rpm, 4 °C) a z buněčné pelety byla prostřednictvím QIAamp DNA Blood Mini kitu (Qiagen Inc., Germantown, MD) izolována genomická DNA (gDNA). Hodnota koncentrace a čistoty gDNA byla určena pomocí NanoQuant Infinite M200 spektrofotometru. Nespotřebované fixované buněčné suspenze i izolovaná gDNA byly zamrazeny a archivovány pro případné další analýzy.

Interfázni fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH)

K detekci nejčastěji se vyskytujících chromozomových aberací jsme použili metodu dvoubarevné I-FISH s panelem přímo značených lokus specifických (LSI) a/nebo centromerických (CEP) sond Vysis (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). Sonda pro sledovanou oblast byla vždy použita v kombinaci s odlišně značenou kontrolní sondou. Hybridizace byla provedena dle návodu doporučeného výrobcem. Přehled DNA sond použitých u jednotlivých nádorových subtypů je uveden v tab. 1. Buňky byly vizualizovány pomocí DAPI (4,6-diamid-2-fenylindol). U každého vzorku bylo dvěma nezá-

vislými pozorovateli zhodnoceno celkem 200 interfázniích jader (na preparát a hybridizační směs). Obraz z fluorescenčního mikroskopu AXIO Imager Z1 (Zeiss) byl zpracován specializovaným softwarem pro I-FISH (*ISIS*, MetaSystem™). Hodnota „cut-off“ byla stanovena na 5 % pro delece či monozomie a na 2,5 % pro amplifikace či nadpočetné chromozomy [16].

Single nucleotide polymorphism (SNP) array

K průkazu změn v genomu nádorových buněk jsme využili SNP array Human CytoSNP-12 BeadChip (Illumina, San Diego, CA). Na čip bylo hybridizováno 200 ng gDNA dle návodu popsaného výrobcem. Výsledný produkt byl naskenován pomocí BeadStation 500 stanice (Illumina) a výsledky byly analyzovány prostřednictvím programu Illumina KaryoStudio (verze 1.4.3.0). Tento program používá k detekci nebalancovaných změn cnv Partition algoritmus (verze 3.0.7.0.), který je založený na poměru očekávané intenzity sond oproti naměřené intenzitě (Log R ratio) a dále pak na předpokládané frekvenci B alely (B allele frequency).

Statistika

Použitím Mantel-Cox testu jsme statisticky porovnali celkové přežití (overall survival – OS) mezi různými skupinami pacientů. Celkové přežití bylo měřeno od data diagnózy do úmrtí či poslední kontroly pacienta.

Výsledky

Klinická data

Vyšetřili jsme 41 nemocných s histologicky prokázanými nízkostupňovými

Tab. 2. Výsledky molekulárně cytogenetických analýz 16 nemocných s oligodendrogliomy.

V tabulce je uveden procentuální rozsah buněčného klonu s příslušnou aberací. U dvou nemocných s oligodendrogliomy (TKO16 a TKO17) nebyla analýza metodou I-FISH provedena z důvodu nedostatku materiálu a byla proto provedena pouze SNP array analýza.

	I-FISH			rozsah nebalancovaných aberací detekovaných metodou SNP array
	delece 1p36	delece 19q13.3	monozomie 9/ delece CDKN2A	
TKO1	93,5 %	88 %	monozomie 24 %	del(1)(p11.2p36.33), -6, -9, -17, -18, del(19)(q12q13.43)
TKO2	74,5 %	81,5 %	monozomie 23,5 %	del(1)(p11.2p36.33), -4, del(7)(p21.1p21.3), -9, -13, del(19)(q12q13.43)
TKO3	53,5 %	49 %	×	del(1)(p11.2p36.33), -4, del(6)(q14.1), +8, +11, del(17)(q21.1q21.31), -18, del(19)(q12q13.43)
TKO4	32 %	36 %	0 %	del(1)(p11.1p36.33), del(14)(q24.1q32.33), del(19)(q12q13.43), del(22)(q13.31q13.33)
TKO5	35,5 %	54 %	0 %	del(1)(p11.2p36.33), -4, -13, del(19)(q12q13.43)
TKO6	62 %	72,5 %	0 %	del(1)(p11.2p36.33), add(12)(p11.21), -15, del(19)(q12q13.43)
TKO7	0 %	0 %	0 %	nebalancované aberace neprokázány
TKO8	3,5 %	2,5 %	0 %	del(1)(p11.2p36.33), del(19)(q12q13.43)
TKO9	75,5 %	82,5 %	0 %	del(1)(p11.2p36.33), del(19)(q12q13.43)
TKO10	11,5 %	10 %	0 %	del(1)(p11.2p36.33), del(19)(q12q13.43)
TKO11	20 %	25 %	delece 19 %	del(1)(p11.2p36.33), -4, -9, +11, -18, del(19)(q12q13.43)
TKO12	0 %	0 %	0 %	del(1)(p11.2p36.33), -9, del(19)(q12q13.43)
TKO13	13 %	19 %	0 %	del(1)(p11.2p36.33), del(4)(q12q35.2), del(9)(p11.2p36.33), del(13)(q21.33q22.3)(q31.1q32.2), del(19)(q12q13.43)
TKO14	0 %	0 %	0 %	nebalancované aberace neprokázány
TKO15	×	×	×	del(1)(p11.2p36.33), del(14)(q23.2q24.3), del(19)(q11q13.43)
TKO16	×	×	×	nebalancované aberace neprokázány

× – vyšetření nebylo provedeno

gliomy, z toho bylo 16 pacientů s oligodendrogliomem a 25 nemocných s difúzním astrocytomem. Celkem se jednalo o 19 žen a 22 mužů. Pacienti s difúzními astrocytomy byli zařazeni do skupiny nízkostupňových astrocytárních gliomů (low-grade astrocytoma – LGA). Nemocní s oligodendrogliálním typem nádorů pak tvořili druhou analyzovanou skupinu (low-grade oligodendroglioma – LGO). Medián věku pacientů s LGA byl v době diagnózy 34 let a u nemocných s LGO 50 let. Medián doby sledování byl v celém souboru 74 měsíců (rozmezí 3–160 měsíců). Průměrné OS bylo pro nemocné s astrocytomy 76 měsíců (rozmezí 8–154 měsíců) a pro nemocné s oligodendrogliomy 86 měsíců (rozmezí 13–167 měsíců). V průběhu stu-

die došlo k progresi nebo recidivě nádoru u 19 pacientů (z toho bylo 10 pacientů s astrocytomy a 9 pacientů s oligodendrogliomy). Patnáct nemocných v průběhu studie zemřelo (10 s astrocytomy, 5 s oligodendrogliomy).

Výsledky I-FISH a SNP array analýz

Celkem u 37 nemocných korespondovaly výsledky I-FISH a SNP array analýz s histologickým a klinickým nálezem a potvrdily tak původní diagnózu. U čtyř nemocných s histologicky definovaným LGA (TKA4, TKA11, TKA13, TKA19) byla detekována kombinovaná delece 1p/19q, která se typicky vyskytuje hlavně u oligodendrogliomů (tab. 2). Výsledek I-FISH a SNP array analýz se shodoval v 96,7 % případu. U čtyř pacientů byla z důvodu ne-

dostatečného množství materiálu provedena buď jenom I-FISH (TKA22, TKA24), nebo jen SNP (TKO16, TKO17) array analýza (tab. 2, 3). Ve většině vzorků byly detekovány tři až čtyři chromozomy s aberacemi (rozmezí 2–9), přičemž u LGA jsme průměrně našli 4,2 aberace na vzorek a u LGO 3,3 aberace na vzorek. Jednalo se o delece, amplifikace či uniparentální disomie (UPD). U šesti pacientů (tři s LGA, tři s LGO) nebyla detekována žádná chromozomová aberace. V obou vyšetřovaných souborech převažoval výskyt delecí/monozomií nad amplifikacemi/trizomiemi (graf 1, 2).

Oligodendrogliomy

Nejčastějším nálezem u nemocných s oligodendrogliálním typem nádoru

Tab. 3. Výsledky molekulárně cytogenetických analýz 25 nemocných s astrocytomy.

V tabulce je uveden procentuální rozsah buněčného klonu s příslušnou aberací. U dvou nemocných (TKA22, TKA24) nebylo možné provést izolaci gDNA pro SNP array analýzu z důvodu malého množství materiálu a byla proto provedena pouze I-FISH s kompletním panelem DNA sond.

	I-FISH			SNP array
	delece <i>RB1</i>	delece <i>TP53</i>	monozomie 9/ delece <i>CDKN2A</i>	
TKA1	0 %	0 %	0 %	del(1)(p36.22p36.33), del(11)(p15.4p15.5), add(12)(p11.2p13.33), UPD(12)(q12q13.13), del(13)(q11q22.3), UPD(17)(p11.2p13.3), add(20)(p11.1p13)
TKA2	0 %	0 %	0 %	del(3)(p26.3p26.3), del(5)(q31.3q35.3), del(6)(q16.3q27), del(7)(p21.1p22.3), add(7)(q31.1q36.3), del(10)(q22.1q26.3)
TKA3	8 %	0 %	0 %	add(4)(q13.1), del(4)(q13.1q35.2), add(5)(p13.2p15.2), del(5)(p15.2p15.33), add(8)(q24.12q24.3), del(11)(p15.2p15.5)del(13)(q11q33.3)(q34q34), UPD(17)(p11.2p13.3), del(21)(q11.2q21.3), del(22)(q12.3q13.33)
TKA4	0 %	0 %	0 %	del(1)(p12p31.1), add(7)(q22.1q13.43), UPD(17)(p11.2p12), del(19)(q13.2q13.43), UPD(20)(q11.22q11.23)
TKA5	0 %	0 %	0 %	UPD(2)(q36.3q37.1), del(3)(q28q29), add(8)(p23.2p23.3), add(8)(q23.3q23.3), del(9)(p21.2p21.3)(p22.1p24.3), del(10)(q25.2q26.3), add(11)(q24.2q25), del(15)(q11.1q15.1)(q15.3q21.3), UPD(17)(p11.2p13.3)
TKA6	20 %	0 %	0 %	del(2)(p11.2p16.2), del(6)(p22.2p25.3), UPD(17)(p11.2p13.3), -22
TKA7	8 %	6,5 %	0 %	del(4)(q33q35.2), add(7)(q22.1q32.1)(q33.2q36.3), del(9)(p23p24.3), 10 cth, del(11)(p15.2p15.5), UPD(12), UPD(17)(p11.2p13.3), del(18)(p11.21p11.32), del(19)(q13.2q13.32)(q13.42q13.43)
TKA8	0 %	0 %	0 %	nebalancované aberace neprokázány
TKA9	0 %	9,5 %	0 %	del(4)(q13.2q35.2), del(5)(p14.3p15.33), del(11)(p11.12p15.5), del(12)(p11.23p12.1), add(12)(p13.2p13.3), -13, add(16)(q22.1q24.3), UPD(17)(p13.1p13.3), del(17)(q21.31q21.32)(q23.3q24.2)(24.2q24.3), -20
TKA10	5 %	0 %	0 %	UPD1(p31.1p31.3), add(10)(p11.22p15.1), del(14)(q23.1q31.3), add(14)(q32.33), UPD(17)(p13.1p13.3), del(19)(q13.32q13.43)
TKA11	0 %	0 %	0 %	del(1)(p11.2p36.33), UPD(17)(p11.2p13.3), del(19)(q12q13.43)
TKA12	0 %	0 %	0 %	UPD(8)(q23.3q23.3), UPD(17)(p11.2p13.3)
TKA13	0 %	0 %	0 %	del(1)(p11.2p36.33), del(19)(q12q13.43)
TKA14	0 %	0 %	0 %	del(2)(q34q37.3), del(4)(q25q35.2), del(5)(p14.3p15.33)(q12.1q35.3), del(6)(q16.3q27), del(10)(q21.3q26.3), del(19)(p13.11q13.43)
TKA15	0 %	0 %	0 %	del(1)(p36.11p36.11), del(1)(q42.13q44), UPD(4)(q28.1q28.2), del(5)(q21.1q35.3), add(12)(p11.22p12.3)(p13.2p13.3), del(14)(q31.1q31.2)(q31.3q31.3), UPD(17)(p11.1p13.3)
TKA16	0 %	0 %	7,5 %	del(6)(q13q21)(q22.2q24.2)(q25.3q27), +7, del(9)(p21.3p22.1), -10, del(14)(q11.2q21.1), del(18)(q12.3q23), -22
TKA17	0 %	0 %	0 %	del(3)(p11.1p26.3)(q28q29), del(7)(p11.2p11.2)(p14.1p22.3), del(12)(q12q22)(q23.1q23.2), del(19)(q13.2q13.43)
TKA18	0 %	0 %	0 %	UPD(2)(p24.1p25.3), add(2)(q11.2q13), del(5)(q14.3q35.3), add(10)(p14p15.3), del(13)(q14.12q22.2), UPD(14)(q11.1q23.3), UPD(17)(p11.2p13.3)
TKA19	0 %	0 %	0 %	del(1)(p11.2p36.33), del(19)(q12q13.43)
TKA20	0 %	0 %	0 %	UPD(7)(q31.2q31.31), del(11)(p15.4p15.5), del(12)(q12q24.31)(q24.31q24.3), UPD(21)(q21.3q22.11)
TKA21	×	0 %	×	UPD(17)(p11.1p13.3), del(22)(q11.21q13.33)
TKA22	0 %	0 %	0 %	z nedostatku materiálu neděláno
TKA23	0 %	0 %	0 %	UPD(17)(p11.2p13.3), del(21)(q21.1q22.11)(q21.1q22.11)(q22.13q22.2), del(22)(q11.1q11.22)
TKA24	0 %	0 %	0 %	z nedostatku materiálu neděláno
TKA25	0 %	0 %	0 %	del(11)(p11.1p15.5), UPD(17)(p12p13.3)

× – vyšetření nebylo provedeno

Obr. 1. Chromozomové aberace detekované metodou SNP array.

A. Rekurentní aberace na chromozomech 1, 7, 13, 17 a 19 nalezené u pacientů s astrocytomy. Červeně je znázorněn rozsah delecí, zeleně amplifikací a šedě UPD. B. Kombinovaná delecí 1p/19q s atypickými zlomovými místy detekovaná u nemocného s astrocytome. Rozsah delecí je vyznačen červeně. Obrázek byl exportovaný z programu KaryoStudia (Illumina). C. Fragmentovaný chromozom 10 s četnými zisky a ztrátami genetického materiálu, pravděpodobně výsledek chromothripsis, detekovaný u nemocného s difúzním astrocytome. Obrázek byl exportovaný z programu KaryoStudia (Illumina).

byla kombinovaná delecí celých ramen 1p/19q, která se vyskytovala u 81,25 % analyzovaných vzorků. Ve většině případů byl však tento nález provázen přítomností dalších aberací, z nichž se rekurentně vyskytovaly delecí na chromozomu 4 (p i q ramena) u 25 % pacientů, delecí 9p u 18,75 % nemocných, delecí 13q a monozomie chromozomu 18 rovněž u 18,75 % pacientů. Čtyři z devíti pacientů s kombinovanou delecí 1p/19q a další aberací detekovanou v době diagnózy během studie zemřeli. U dalšího pacienta z této skupiny došlo k progresi. U tří nemocných s delecí 1p/19q nebyly nalezeny žádné další chromozomové změny. V celém souboru pak nebyly pozorovány žádné aberace v chromozomových oblastech 1q, 3q, 19p a na chromozomech 2, 5, 16, 20 a 21. Výsledky LGO vzorků byly shrnuty v grafu 1 a tab. 3.

Astrocytomy

Nálezy ve vzorcích astrocytálních nádorů byly více heterogenní, než tomu

bylo u oligodendrogliomů. Mezi často se opakující aberace patřily delecí zasahující krátká ramena chromozomu 1 nalezené ve 24 % vzorků, amplifikace dlouhých ramen chromozomu 7 (oblast q31.1–qter) přítomná v 16 % vzorků, delecí na chromozomu 13 (oblast q21.3–q22.3) detekovaná u 20 % případů a delecí dlouhých ramen chromozomu 19 prokázána ve 28 % (obr. 1A, graf 1, tab. 2). Vůbec nejčastějším nálezem v této skupině byla segmentovaná UPD na krátkých ramenech chromozomu 17 (oblast p13.1–p13.3), kterou jsme detekovali v 60 % případů. U těchto nemocných jsme pozorovali trend k horšímu OS než u ostatních nemocných, i když pravděpodobně vzhledem k nízkému počtu vyšetřených pacientů nebyl zatím rozdíl statisticky významný ($p = 0,844$). Sedm ze 14 nemocných s detekovanou UPD na chromozomu 17 během studie zemřelo. Ve čtyřech případech LGA byla nalezena kombinovaná delecí 1p/19q. V jednom ze vzorků (TKA4) jsme pozorovali atypickou kombinovanou delecí, která ne-

zasahovala celá ramena chromozomu 1 a 19, ale jen části chromozomu 1 (oblast p12–p31.1) a chromozomu 19 (oblast q13.2–q13.43), a tedy vznikla jiným mechanismem, než je nebalancovaná aberace der(1;19)(q10;p10) (obr. 1B). V dalším vzorku (TKA7) jsme pozorovali fragmentovaný chromozom 10 s velkým počtem delecí a amplifikací (obr. 1C). V této skupině postihovaly nebalancované změny všechny chromozomy, žádné aberace nebyly detekovány pouze na krátkých ramenech chromozomu 4 (4p) a na krátkých ramenech chromozomu 16 (16p) (graf 2).

Diskuze

Nízkostupňové gliomy patří k nejčastějším typům mozkových nádorů. Jejich difúzní charakter a komplikovaná histologická klasifikace je řadí mezi obtížně diagnostikovatelné typy malignit. Z terapeutického hlediska je pro pacienta zásadní již při úvodní diagnóze jednoznačně určit, zda se jedná o oligodendrogliom, astrocytom či oligoastrocy-

Graf 1. Frekvence aberací detekovaných metodou SNP array u pacientů s oligodendrogliomy.

Krátká ramena chromozomu značena p, dlouhá ramena q. Ve spodní části grafu jsou tmavě modře znázorněny delece, v horní části grafu jsou světle modře znázorněny amplifikace a šedě UPD.

tom. Histologická klasifikace však může být vzhledem k vysoké heterogenitě těchto nádorů nejednoznačná. Z tohoto důvodu jsou cytogenetické a molekulární metody dalším vhodným nezávislým diagnostickým přístupem. Jejich výsledky nejen doplňují histologické nálezy, ale v některých případech mohou i přispět k upřesnění původní diagnózy [21,22].

V naší studii výsledky molekulární cytogenetické analýzy potvrdily histologický nález u 92,6 % nemocných. U čtyř pacientů s histologicky diagnostikovaným astrocytomech jsme prokázali přítomnost kombinované delece 1p/19q, tj. aberace typické pro oligodendrogliomy, a upřesnili tak původní diagnózu na smíšený oligoastrocytom. Celkem u 10 nemocných s LGO jsme kromě specifické delece 1p/19q detekovali i další genomové změny, které by mohly mít vliv na prognózu onemocnění. U čtyř těchto nemocných již došlo k progresi

nádoru nebo k exitu. Nepříznivý vliv dalších chromozomových aberací v buňkách s delecí 1p/19q na průběh onemocnění jsme rovněž pozorovali v naší dřívější studii u nemocných s anaplastickými oligodendrogliomy a oligoastrocytomy (WHO grade III) [16]. V obou vyšetřovaných skupinách jsme detekovali aberace charakteristické pro daný subtyp nízkostupňového difuzního nádoru v četnostech shodujících se s výskytem popsaným v literatuře [7,8,23,24]. Jednotlivé soubory se však mezi sebou lišily v zahrnutí konkrétních chromozomů v chromozomových aberacích. U oligodendrogliomů nebyly detekovány žádné aberace u chromozomů 2, 5, 16, 20 a 21 a v oblastech 1p, 3q a 19p, zatímco u astrocytomů byly takovéto chromozomové oblasti jen dvě – 4p a 16p. Z toho je možné usuzovat, že v případě nemocných s difuzními astrocytomy může docházet k nahodilému vzniku aberací u různých chromozomů, a bude

tedy složitější definovat nějaký společný molekulárně cytogenetický ukazatel. Nelze vyloučit, že roli v této nahodilosti změn má právě specifická mutace *IDH1* a *IDH2*.

Podle dosud publikovaných nálezů i podle našich vlastních pozorování je společným rysem astrocytomů absence chromozomových aberací v oblasti 4p [7,8,23,24]. Naopak u oligodendrogliomů, jak popsali Idbaih et al a Rossi et al, dochází k rekurentní ztrátě krátkých ramen chromozomu 4 [25,26]. V našem souboru LGO jsme našli celkem čtyři nemocné s delecí 4p (25 %) (graf 2, tab. 3). Tato oblast zahrnuje geny regulující buněčný cyklus (např. *CTBP1*), tumor supresory (*SLIT2*, *FGFR3*, *APBB2*), geny regulující buněčnou diferenciaci (např. *PHOX2B*) a geny regulující apoptózu (např. *UCHL1*). Ztráta exprese těchto genů vlivem delece v oblasti 4p by mohla vést ke zvýšené proliferaci nádorové buňky či tumorigenezi

Graf 2. Frekvence aberací detekovaných metodou SNP array u pacientů s astrocytomy.

Krátká ramena chromozomu značena p, dlouhá ramena q. Ve spodní části grafu jsou tmavě modře znázorněny delece, v horní části grafu jsou světle modře znázorněny amplifikace a šedě UPD.

obecně a tím přispět ke vzniku rezistence k léčbě. Skutečný prognostický význam této delece však bude nutné ověřit v dalších studiích na dostatečně velkých souborech pacientů.

Za jeden z možných mechanismů zodpovědných za iniciaci a progresi nádoru je v současné době považována segmentální uniparentální disomie [27]. UPD může zapříčinit duplikaci heterozygotní somatické či vrozené mutace vedoucí k inaktivaci tumor supresorového genu, nebo naopak ke zvýšené proliferaci díky přítomnosti dvou kopií mutovaného onkogenu. Jedním z takových genů je i *TP53* lokalizovaný v oblasti 17p13.1. Molekulární abnormality zahrnující dráhu genu *TP53* jsou obvykle jednou z raných událostí v patogenezi difuzních astrocytomů [1]. Populační studie dokázaly, že u difuzních astrocytomů je incidence vzniku mutace *TP53* přibližně 53 %, u oligoastrocytomů 44 % a u oligodendrogliomů 13 % [28].

V našem souboru LGA jsme v 60 % případů detekovali segmentální UPD na krátkých ramenech chromozomu 17. Vzhledem k tomu, že se v této oblasti vyskytuje *TP53*, je možné, že pozorovaná segmentální UPD je asociovaná s mutací v tomto genu. V další studii proto budeme pokračovat v analýze mutačního stavu *TP53* u těchto nemocných. Přestože se zatím jedná pouze o malou skupinu a výsledky nejsou statisticky významné, statistická analýza celkového přežití ukázala trend v horším přežívání u pacientů s potvrzenou UPD 17p ve srovnání s nemocnými bez této aberace. Aby bylo možné tento trend statisticky potvrdit, bude jistě nezbytné vyšetřit větší soubory pacientů s LGA a případně doplnit i mutační analýzu *TP53* genu.

Dalším nedávno popsáním mechanismem zodpovědným za vznik chromozomových aberací je jev označovaný jako „chromothripsis“. Tento jev je charakteristický tím, že v jediný kritický moment

dochází k rozpadu jednoho či více chromozomů v nádorové buňce na desítky až stovky malých částí. Některé z těchto částí jsou pak v průběhu dalšího buněčného dělení ztraceny nebo naopak amplifikovány, zatímco zbylé jsou reparačními mechanismy opět náhodně spojeny dohromady, čímž vznikají vysoce přestavěné chromozomy. Chromothripsis byla poprvé popsána u pacientky s chronickou lymfocytární leukémií (chronic lymphocytic leukemia – CLL) a podle dosud publikovaných literárních údajů je přítomna zhruba u 2–3 % všech typů maligních onemocnění [29,30]. Zdá se však, že její skutečná incidence bude ve skutečnosti mnohem vyšší, než se původně předpokládalo, a to zejména u agresivnějších typů nádorů. Klinický význam chromothripsis u různých typů nádorových onemocnění zatím není zcela jasný vzhledem k heterogenitě a dosud relativně malému počtu publikovaných případů [31]. V našem souboru jsme takto

rozpadlý chromozom 10, pravděpodobně v důsledku chromothripsis, pozorovali u jednoho pacienta s difúzním astrocytomem. Klinický stav tohoto pacienta je v současné době dobrý a budeme jej dále sledovat.

Závěr

Molekulárně cytogenetickými metodami jsme u 16 pacientů s LGO a 25 pacientů s LGA potvrdili přítomnost známých chromozomových aberací charakteristických pro dané subtypy nízkostupňových gliomů. Kromě toho jsme u 10 nemocných s LGO detekovali další rekurentní změny, nejčastěji delece 4p, 9p či 13q. Jaký je přesný význam těchto genomových změn a zda může přítomnost dalších aberací v nádorových buňkách s prognosticky významnou delecí 1p/19q ovlivnit prognózu nemocných, je stále předmětem diskuze. V naší studii jsme u pacientů s těmito nálezy pozorovali zvýšené riziko progresu nádoru, i když rozdíl zatím nebyl statisticky významný. U čtyř nemocných s difúzními astrocytomy jsme díky molekulárně cytogenetickým metodám mohli odlišit nádor s oligodendrogliální buněčnou složkou od čistě astrocytálního typu gliomu a upřesnit tak původní diagnózu. Kromě toho jsme u nemocných s LGA detekovali řadu dalších zajímavých chromozomových aberací, jako byla např. chromothripsis chromozomu 10 nebo kombinovaná delece 1p/19q s atypickými zlomovými místy. Významným nálezem byla zejména segmentální UPD 17p přítomná u více než poloviny pacientů s LGA, u kterých jsme rovněž pozorovali trend k horšímu OS. Ačkoliv mnoho otázek týkajících se klasifikace a progresu nízkostupňových gliomů zůstává stále nezodpovězeno, kombinací nových přístupů vzniká další užitečný analytický nástroj umožňující upřesnit diagnózu a v některých případech i prognózu onemocnění. Naše pilotní výsledky tak mohou sloužit jako

východisko pro další molekulárně cytogenetické studie na větších souborech nemocných.

Literatura

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* 2007; 114(2): 97–109.
2. Huttner A. Overview of primary brain tumors: pathologic classification, epidemiology, molecular biology, and prognostic markers. *Hematol Oncol Clin North Am* 2012; 26(4): 715–732. doi: 10.1016/j.hoc.2012.05.004.
3. Crocetti E, Trama A, Stiller C et al. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer* 2012; 48(10): 1532–1542. doi: 10.1016/j.ejca.2011.12.013.
4. Godard S, Getz G, Delorenzi M et al. 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 Res* 2003; 63(20): 6613–6625.
5. Bulik M, Jancalek R, Vanicek J et al. Potential of MR spectroscopy for assessment of glioma grading. *Clin Neurol Neurosurg* 2013; 115(2): 146–153. doi: 10.1016/j.clineuro.2012.11.002.
6. Labussière M, Idbaih A, Wang XW et al. All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology* 2010; 74(23): 1886–1890. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181e1cf3a.
7. Idbaih A, Marie Y, Lucchesi C et al. BAC array CGH distinguishes mutually exclusive alterations that define clinicogenetic subtypes of gliomas. *Int J Cancer* 2008; 122(8): 1778–1786.
8. Roerig P, Nessling M, Radlwimmer B et al. Molecular classification of human gliomas using matrix-based comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 2005; 117(1): 95–103.
9. Jeuken JW, von Deimling A, Wesseling P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. *J Neurooncol* 2004; 70(2): 161–181.
10. Cairncross G, Jenkins R. Gliomas with 1p/19q codeletion: a.k.a. oligodendroglioma. *Cancer J* 2008; 14(6): 352–357. doi: 10.1097/PP0.0b013e31818d8178.
11. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* 2006; 66(20): 9852–9861.
12. Griffin CA, Burger P, Morsberger L et al. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65(10): 988–994.
13. Cairncross G, Berkey B, Shaw E et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup radiation therapy oncology group trial 9402. *J Clin Oncol* 2006; 24(18): 2707–2714.
14. Cairncross G, Wang MH, Shaw E et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol* 2013; 31(3): 337–343. doi: 10.1200/JCO.2012.43.2674.
15. Jurga LM, Malý M. Úskalí kombinované radiochemoterapie a bioterapie maligních gliómů. *Klin Onkol* 2006; 19(6): 317–320.
16. Zemanová Z, Kramar F, Babická L et al. Molecular cytogenetic stratification of recurrent oligodendrogliomas:

utility of interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH). *Folia Biol* 2006; 52(3): 71–78.

17. Wiltshire RN, Rasheed BK, Friedman HS et al. Comparative genetic patterns of glioblastoma multiforme: potential diagnostic tool for tumor classification. *Neuro Oncol* 2000; 2(3): 164–173.
18. Holland H, Ahnert P, Koschny R et al. Detection of novel genomic aberrations in anaplastic astrocytomas by GTG-banding, SKY, locus-specific FISH, and high density SNP-array. *Pathol Res Pract* 2012; 208(6): 325–330. doi: 10.1016/j.prp.2012.03.010.
19. Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet* 2012; 205(12): 613–621. doi: 10.1016/j.cancergen.2012.10.009.
20. Vránová V, Necesalová E, Kuglík P et al. Screening of genomic imbalances in glioblastoma multiforme using high-resolution comparative genomic hybridization. *Oncol Rep* 2007; 17(2): 457–464.
21. Cowell JK, Lo KC, Luce J et al. Interpreting aCGH-defined karyotypic changes in gliomas using copy number status, loss of heterozygosity and allelic ratios. *Exp Mol Pathol* 2010; 88(1): 82–89. doi: 10.1016/j.yexmp.2009.09.014.
22. Belaud-Rotureau MA, Meunier N, Eimer S et al. Automated assessment of 1p36–19q13 status in gliomas by interphase FISH assay on touch imprints of frozen tumours. *Acta Neuropathol* 2006; 111(3): 255–263.
23. Wiltshire RN, Herndon JE, Lloyd A et al. Comparative genomic hybridization analysis of astrocytomas – prognostic and diagnostic implications. *J Mol Diagn* 2004; 6(3): 166–179.
24. Li YB, Wang DP, Wang L et al. Distinct genomic aberrations between low-grade and high-grade gliomas of Chinese patients. *PLoS One* 2013; 8(2): e57168. doi: 10.1371/journal.pone.0057168.
25. Idbaih A, Crinière E, Ligon KL et al. Array-based genomics in glioma research. *Brain Pathol* 2010; 20(1): 28–38. doi: 10.1111/j.1750-3639.2009.00274.x.
26. Rossi MR, Gaile D, Laduca J et al. Identification of consistent novel submegabase deletions in low-grade oligodendrogliomas using array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(1): 85–96.
27. Tuna M, Knuutila S, Mills GB. Uniparental disomy in cancer. *Trends Mol Med* 2009; 15(3): 120–128. doi: 10.1016/j.molmed.2009.01.005.
28. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* 2004; 108(1): 49–56.
29. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011; 144(1): 27–40. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.055.
30. Maher CA, Wilson RK. Chromothripsis and human disease: piecing together the shattering process. *Cell* 2012; 148(1–2): 29–32. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.006.
31. Gaiser T, Gaiser MR, Hirsch D et al. Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2013; 133: S56–S56. doi:10.1038/jid.2013.96.