

## ARTYKUŁ REDAKCYJNY

Magdalena Zakrzewska, Paweł P. Liberski

Received: 04.08.2005

Accepted: 31.08.2005

Published: 30.09.2005

**Utrata heterozygotyczności w nowotworach mózgu pochodzenia zarodkowego u dzieci**

Loss of heterozygosity in paediatric embryonal brain tumours

Correspondence to: Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź

Source of financing: The study was partially supported by Polish State Research Committee, grant no. 3 P05B 158 23

**Streszczenie**

Nowotwory mózgu pochodzenia zarodkowego są najliczniejszą grupą złośliwych nowotworów litych u dzieci, u których stanowią około 12-25% wszystkich rozrostów nowotworowych zlokalizowanych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Najczęściej rozpoznawaną jednostką z tej grupy jest rdzeniak (MB), nieco rzadziej nadnamiotowy prymitywny nowotwór neuroektodermalny (sPNET) oraz atypowy nowotwór teratoidny/rabdoidny (AT/RT). Utrata materiału genetycznego jest w tych nowotworach częstym zjawiskiem, które można stwierdzić m.in. dzięki ocenie obecności utraty heterozygotyczności (*loss of heterozygosity*, LOH). Wykorzystywane jest ono do identyfikacji regionów chromosomalnych mogących zawierać geny supresorowe transformacji nowotworowej. Analizie poddano materiał pochodzący od 35 dzieci (17 dziewcząt i 18 chłopców) w wieku 1-13 lat. Wśród badanych nowotworów znajdowało się 26 MB, 6 sPNET i 3 AT/RT. Badana grupa obejmowała 35 przypadków nowotworów pierwotnych i 12 przypadków nowotworów nawrotowych. DNA, wyizolowany z tkanek nowotworowych oraz z leukocytów krwi obwodowej (materiał kontrolny), powielano podczas reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction*, PCR) przy użyciu syntetycznych starterów oligonukleotydowych. W grupie nowotworów pierwotnych LOH stwierdzono w 21 przypadkach (60%). W 14 przypadkach nie potwierdzono LOH w żadnym z badanych obszarów. Najwięcej przypadków LOH odnotowano na chromosomach 17p, 22q i 10q, natomiast w żadnym przypadku nie stwierdzono LOH na chromosomach 1p, 1q i 5q. W jednym przypadku nowotworu nawrotowego zdiagnozowano progresję zmian molekularnych. W nowotworze pierwotnym LOH obecna była na chromosomie 10q i 17p, z kolei w nowotworze nawrotowym dodatkowe obszary delecji obejmowały oba ramiona chromosomu 16. LOH występuje z różną częstością w poszczególnych typach histologicznych nowotworów pochodzenia zarodkowego i w większości przypadków nie ma charakteru zmian swoistych. Progresja zmian molekularnych w nawrotowych nowotworach pochodzenia zarodkowego jest zjawiskiem wyjątkowo rzadkim i może być następstwem radioterapii.

**SŁOWA KLUCZOWE:** AT/RT, nowotwory mózgu pochodzenia zarodkowego, rdzeniak, sPNET, utrata heterozygotyczności

**Summary**

Embryonal tumours, the most common group of malignant solid tumours in children consist about 12-25% of all brain tumours of childhood. The most frequent types are: medulloblastoma (MB), supratentorial primitive neuroectodermal tumour (sPNET) and atypical teratoid/rhabdoid tumour (AT/RT). The loss of genetic material in embryonal tumours is the most often described abnormality, which may be confirmed by loss

of heterozygosity analysis (LOH). This method is used to identifying regions harboring putative suppressor genes. 35 children (18 male and 17 female), aged from one year to 13 years were included in this study. There were 26 MB, six sPNETs and three AT/RTs. DNA isolated from tumour tissues and blood samples (control) was amplified in polymerase chain reaction (PCR) with polymorphic markers. Molecular analyses were performed for 35 primary and 12 recurrent tumours. LOH was found in 21 primary tumours (60%). In 14 cases no alteration for all analysed region was confirmed. LOH was detected most often on chromosomes 17p, 22q and 10q. There was no alterations on chromosomes 1p, 1q and 5q. Progression of the molecular changes occurred in one case of recurrent medulloblastoma. LOH on 10q and 17p was found in both primary and recurrent tumour, while losses on 16p and 16q occurred only in the recurrent tumour. The occurrence of LOH in the particular types of tumours is quite different and not specific. Progression of molecular changes in recurrent tumors is rare event and could be connected with radiotherapy.

**KEY WORDS:** AT/RT, embryonal brain tumours, medulloblastoma, sPNET, loss of heterozygosity

## WSTĘP

Nowotwory mózgu pochodzenia zarodkowego stanowią najliczniejszą grupę nowotworów złośliwych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) u dzieci. Na podstawie danych epidemiologicznych częstość ich występowania określa się na 12-25% spośród wszystkich rozrostów nowotworowych w tej grupie wiekowej<sup>(1,2)</sup>. W obecnie obowiązującej klasyfikacji nowotworów mózgu wg WHO w grupie nowotworów pochodzenia zarodkowego wyróżnia się 5 głównych typów histologicznych:

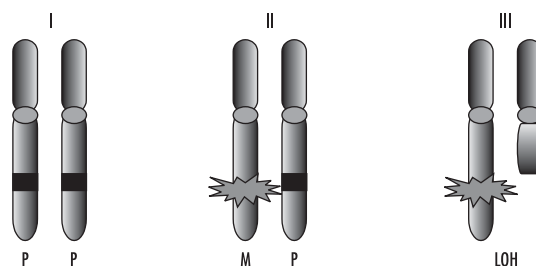
1. nabłoniak rdzeniowy (*medulloepithelioma*),
2. wyściółczak zarodkowy (*ependymoblastoma*),
3. rdzeniak (*medulloblastoma*, MB):
  - rdzeniak desmoplastyczny (*desmoplastic medulloblastoma*),
  - rdzeniak olbrzymiokomórkowy (*large cell medulloblastoma*),
  - rdzeniakomięśniak (*medullomyoblastoma*),
  - rdzeniak barwnikowy (*melanotic medulloblastoma*),
4. nadnamiotowy prymitywny nowotwór neuroektodermalny (*supratentorial primitive neuroectodermal tumour*, sPNET):
  - *neuroblastoma*,
  - *ganglioneuroblastoma*,
5. atypowy nowotwór teratoidny/rabdoidny (*atypical teratoid/rhabdoid tumour*, AT/RT).

Wszystkie nowotwory pochodzenia zarodkowego charakteryzuje IV, najwyższy stopień złośliwości histologicznej. Spośród nich najczęściej rozpoznawany jest rdzeniak (MB), rzadziej nadnamiotowy prymitywny nowotwór neuroektodermalny (sPNET) i atypowy nowotwór teratoidny/rabdoidny (AT/RT), pozostałe jednostki występują wyjątkowo rzadko<sup>(3)</sup>. W nowotworach tych opisano dotychczas szereg zmian molekularnych wskazujących na zaangażowanie w procesy onkogenezy wielu genów<sup>(4-12)</sup>. Jednym z częściej opisywanych zaburzeń jest utrata materiału genetycznego, która w większości przypadków jest związana z obecnością genów supresorowych transformacji nowotworowej. Potwierdzenie tych zmian jest

możliwe m.in. dzięki ocenie obecności utraty heterozygotyczności (*loss of heterozygosity*, LOH) przy użyciu markerów mikrosatelitarnych. Do powstania LOH w komórkach obciążonych mutacją genu supresorowego najczęściej prowadzi delecja fragmentu chromosomu; wśród rzadziej występujących przyczyn wymienia się nondysjunkcję, rekombinację mitotyczną, mutacje punktowe, nie zrównoważone translokacje, błędy replikacyjne oraz konwersję genów (rys. 1)<sup>(13,14)</sup>. Ocena obecności LOH przy użyciu markerów mikrosatelitarnych jest obecnie z powodzeniem wykorzystywana do identyfikacji regionów chromosomalnych, które mogą zawierać geny supresorowe.

## CEL PRACY

1. Ocena obecności LOH w miejscach lokalizacji znanych genów supresorowych mogących odgrywać rolę w rozwoju nowotworów mózgu pochodzenia zarodkowego: *APC*, *AXIN1*, *DMBT1*, *hSNF5/INI1*, *PTCH1*, *PTEN*, *SUFU*.
2. Ocena obecności LOH w okolicach mogących obejmować *loci* dla dotychczas niezidentyfikowanych genów tego typu na chromosomach 1, 16, i 17.
3. Próba znalezienia zależności pomiędzy typem histologicznym nowotworu a rodzajem stwierdzonych zaburzeń molekularnych.



Rys. 1. Najczęstszy mechanizm prowadzący do wyłączenia funkcji genu supresorowego związany z obecnością LOH. Mutacja w jednym allele jest pierwszą zmianą poprzedzającą delecję kolejnego allele: P – allele prawidłowy, M – allele zmutowany, LOH – utrata heterozygotyczności

Kod chorego	Płeć	Wiek (lata)	Umiejscowienie nowotworu
MB-1	M	13	lewa półkula mózdzku
MB-2	Ż	8	prawa półkula mózdzku
MB-3	M	13	robak mózdzku
MB-4	M	10	komora IV
MB-5	Ż	9	robak mózdzku
MB-6	M	11	robak mózdzku
MB-7	M	1	robak mózdzku
MB-8	M	4	robak mózdzku
MB-9	M	6	proces rozsiany
MB-10	M	2	komora IV i III
MB-11	Ż	6	prawa półkula mózdzku
MB-12	Ż	8	robak mózdzku
MB-13	M	4	komora IV
MB-14	M	6	robak mózdzku
MB-15	M	7	komora IV
MB-16	M	8	robak mózdzku
MB-17	Ż	2	prawa półkula mózdzku
MB-18	Ż	2	komora IV
MB-19	Ż	2	komora III i IV
MB-20	Ż	8	lewa półkula mózdzku
MB-21	M	11	komora IV
MB-22	Ż	9	komora IV
MB-23	Ż	8	robak mózdzku
MB-24	Ż	6	lewa półkula mózdzku
MB-25	M	4	robak mózdzku

Tabela 1. Dane kliniczne chorych z rdzeniakami (MB)

4. Analiza obecności powyższych zmian molekularnych w przypadkach nawrotowych procesów nowotworowych.

### CHARAKTERYSTYKA BADANEJ GRUPY CHORYCH

Badaniami objęto grupę 35 dzieci w wieku 1-13 lat operowanych z powodu nowotworów mózgu pochodzenia zarodkowego, wśród których było 17 dziewcząt i 18 chłopców. Wszystkie rozpoznania postawiono w oparciu o kryteria obowiązującej klasyfikacji guzów mózgu Światowej Organizacji Zdrowia<sup>(3)</sup>. Bezpośredni materiał do badań molekularnych stanowiły fragmenty tkanek nowotworowych i leukocyty wyizolowane z krwi obwodowej chorych (materiał kontrolny). Wśród dostępnego materiału biologicznego znajdowały się tak-

że tkanki nowotworowe z 12 procesów nawrotowych (7 rdzeniaków, 4 sPNET i 1 AT/RT). Pozwoliło to na przeprowadzenie analizy porównawczej ewentualnych zmian molekularnych obecnych w nowotworach pierwotnych i wtórnych. Dane kliniczne chorych uwzględnionych w analizach molekularnych przedstawiono w tabelach (tab. 1-4).

### OPIS ZASTOSOWANYCH METOD BADAWCZYCH

Po izolacji DNA z fragmentów tkanek nowotworowych i leukocytów krwi obwodowej standardową metodą chloroformowo-fenolową wybrane części genomu powielano podczas reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction*, PCR). Mieszanina reakcyjna o objętości 20 µl zawierała: 50-100 ng matrycy DNA, 0,5 µm każ-

Kod chorego	Płeć	Wiek (lata)	Umiejscowienie nowotworu
PNET-1	Ż	1	okolica czołowa prawa
PNET-2	Ż	2	okolica czołowa prawa
PNET-3	Ż	12	okolica skroniowo-potyliczna lewa
PNET-4	M	2	okolica skroniowa lewa
PNET-5	M	10	okolica ciemieniowo-potyliczna prawa
PNET-6	M	11	okolica ciemieniowo-potyliczna prawa

Tabela 2. Dane kliniczne chorych z prymitywnymi nowotworami neuroektodermalnymi o lokalizacji nadnamiotowej (sPNET)

Kod chorego	Płeć	Wiek (lata)	Umiejscowienie nowotworu
ATRT-1	Ż	1	komora IV
ATRT-2	M	1	okolica czołowo-ciemieniowa lewa
ATRT-3	Ż	2	okolica skroniowa lewa

Tabela 3. Dane kliniczne chorych z atypowymi nowotworami teratoidnymi/rabdoidnymi (AT/RT)

dego z dwóch starterów, 50 µm dNTP, 1,5 mm MgCl<sub>2</sub> i 1 U Taq polimerazy (Promega). Po 5 minutach denaturacji wstępnej w 94°C następowało 32-37 cykli amplifikacji złożonych z denaturacji (94°C/60 s), przyłączania starterów (51-63°C/60 s) i wydłużania produktów reakcji (72°C/60 s). Temperatura topnienia ustalana była dla każdej pary starterów indywidualnie. Produkty reakcji PCR rozdzielane były kolejno: podczas elektroforezy w 2% żelu agarozowym (w celu potwierdzenia prawidłowości przebiegu reakcji PCR), a następnie podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (w celu wizualizacji wyników dzięki znakowaniu starterów barwnikiem fluorescencyjnym). Ostatni rozdział elektroforetyczny przeprowadzano przy użyciu automatycznego sekwenatora IR<sup>2</sup> firmy LiCor. Efektem końcowym było uzyskanie układu prążków odpowiadającego allelom mikrosatelitarnym, co pozwalało na przeprowadzenie oceny utraty heterozygotyczności i klasyfikację analizowanych przypadków do jednej z trzech grup wyróżnionych według następujących założeń:

1. heterozygota – przypadki informacyjne z zachowanymi dwoma allelami dla danego *locus*, w materiale nowotworowym i w tkance prawidłowej,
2. utrata heterozygotyczności (LOH) – przypadki informacyjne z utraconym jednym allelem lub ze znacznie obniżoną intensywnością względną prążków w materiale nowotworowym dla danego markera mikrosatelitarnego,
3. homozygota – przypadki nieinformacyjne względem analizowanego *locus* (rys. 2).

Analizy przeprowadzono dla 32 starterów, wyboru których dokonano w oparciu o istniejące bazy danych (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (tabela 5).

## WYNIKI

### UTRATA MATERIAŁU GENETYCZNEGO W NOWOTWORACH PIERWOTNYCH

Utratę heterozygotyczności stwierdzono w 21 przypadkach, co stanowi 60% badanych nowotworów, natomiast w 14 przypadkach nie potwierdzono LOH na żadnym z badanych chromosomów. W analizowanym materiale zmiana ta najczęściej obejmowała chromosom 17 i była obecna w 15 nowotworach – w tym w 14 rdzeniakach i w 1 sPNET, co stanowiło 43% wszystkich badanych przypadków. Odsetek ten dla samych rdzeniaków wynosił 58% (14/26), a dla sPNET 16% (1/6). We wszystkich przypadkach LOH została potwierdzona dla co najmniej dwóch *loci* mikrosatelitarnych. W większości otrzymano dane wskazujące na utratę całego ramienia 17p. W nowotworach oznaczonych kodem: MB-1, MB-4, MB-7, MB-8, MB-9, MB-11, MB-13, MB-14, MB-15, MB-16, MB-17 i MB-22 obraz potwierdzający obecność LOH uzyskano zarówno dla *loci* położonych okołocentromerowo (D17S976, D17S1843), jak i dla tych zlokalizowanych w dystalnej części ramienia 17p (D17S849, D17S1828, D17S675, D17S729). W dwóch przypadkach obszar delekcji był mniejszy (MB-19, MB-21). Analiza mikrosatelitarna przeprowadzona dla *loci* położonego na długim ramieniu 17q potwierdziła jego utratę w 3 przypadkach (MB-7, MB-14, MB-22), co świadczy o stracie całego chromosomu 17. Markery mikrosatelitarne wykorzystane do analiz obejmowały *loci* dla genów supresorowych mogących odgrywać rolę w przebiegu rdzeniaków: *HIC-1* i *REN<sup>KCTD11</sup>*, jednak rozmiary delekcji przemawiają za utratą dużej części materia-

Kod chorego	Płeć	Wiek (lata)	Umiejscowienie nowotworu
MB-2W	Ż	12	prawa półkula mózdku
MB-6W	M	13	okolica skroniowa lewa
MB-9W	M	8	robak mózdku
MB-17W	Ż	4	prawa półkula mózdku
MB-19W	Ż	3	robak mózdku
MB-20W	Ż	10	lewa półkula mózdku
MB-21W	M	16	komora IV
PNET-5-W1	M	12	okolica ciemieniowo-potyliczna prawa
PNET-5-W2	M	12	okolica ciemieniowo-potyliczna prawa
PNET-5-W3	M	13	okolica ciemieniowo-potyliczna prawa
PNET-5-W4	M	13	okolica ciemieniowo-potyliczna prawa
ATRT-3-W	Ż	4	okolica skroniowa lewa

Tabela 4. Dane kliniczne chorych z nawrotem procesu nowotworowego

lu genetycznego zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 17 i tym samym za utratą wyżej wymienionych oraz innych, dotąd niezdefiniowanych genów supresorowych transformacji nowotworowej. LOH, liczona tylko dla przypadków informacyjnych, wykazała największą częstość występowania dla *loci* D17S729 (45%), D17S849 (44%) oraz D17S1828 (41%), przy czym należy zaznaczyć, że częstość występowania LOH w poszczególnych *loci* była podobna (tab. 6).

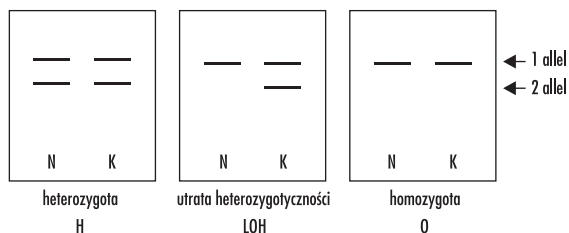
LOH na długim ramieniu chromosomu 10 stwierdzono w pięciu przypadkach (cztery rdzeniaki, jeden sPNET). Markery mikrosatelitarne obejmowały *loci* trzech genów

supresorowych transformacji nowotworowej mających znaczenie w onkogenezie nowotworów mózgu: *P TEN* (D10S1709), *SUFU* (D10S1267) i *DMBT1* (D10S587). W materiale nowotworowym oznaczonym kodem MB-9 wynik świadczący o utracie heterozygotyczności potwierdzono dla trzech *loci* (D10S1709, D10S1267, D10S587), co świadczy o stracie obszaru obejmującego region dla wszystkich badanych genów; w przypadkach MB-11 i MB-22 obecność wyników nieinformacyjnych utrudnia precyzyjne określenie rozmiaru delecji; zachowanie heterozygotyczności dla *loci* D10S1267, D10S209 i D10S587 w przypadku MB-16 wskazuje na utratę tyl-

Nazwa	Lokalizacja	Sekwencja	Długość produktu (bp)	Temperatura topnienia
D1S162	1p33	5'-TCATGCTCCTCCCAAG-3' 5'-GAGCAAGCATCAAAAACGA-3'	115-129	57°C
D1S2720	1p33	5'-AGCTACAAGTCTTACTGACA-3' 5'-AATGGTCAAGGCAAGT-3'	235-245	59°C
D1S510	1q25	5'-AACCGAGGTGTCTGTGG-3' 5'-AGGGAAACAATGTGACCTGTAT-3'	173-195	53°C
D1S306	1q32	5'-ACAGTCTTCCCTTCTC-3' 5'-AAGTCTTCTCTGCAACC-3'	152	53°C
D1S2636	1q32	5'-GGCATCTGTGTGGAACT-3' 5'-GAGACCCCTGGTGGTAC-3'	216-224	57°C
D1S237	1q41	5'-AATGCTATTCTGACATACAGC-3' 5'-TACCCGAGGTAAGTGGTTG-3'	259	59°C
D1S180	1q43	5'-TCCCTAAAGACTGCAAGCT-3' 5'-ACAGAGTCAACTGTGTGG-3'	100-500	53°C
D5S346	5q22	5'-ACTCACTAGTGATAAATCG-3' 5'-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'	96-122	53°C
D9S319	9p11	5'-GCCAGTGTCTCCAGAGAAA-3' 5'-TGGGATATGTCAAGCAAAAT-3'	173	55°C
D9S299	9q32	5'-AAGTGTGATCAGAGCTC-3' 5'-AGTGTGAACATTATTCATTGG-3'	192	55°C
D10S1709	10q23	5'-GTGAGTCCAGATCAACC-3' 5'-CAGTGGAAATGGCTATTG-3'	158-174	55°C
D10S1267	10q23	5'-AGGATGTCAACATACTGGGTAG-3' 5'-GGAGCTGGAGGTAAAG-3'	175-213	63°C
D10S209	10q26	5'-CAAATGTGCTCATATCTGC-3' 5'-CCCATAGTAGTAAAGGGGC-3'	181-216	53°C
D10S587	10q26	5'-AATAACAGGCCAGATTCT-3' 5'-AAAAGCAGACATCTGAAGAG-3'	150	51°C
D16S521	16p13	5'-AGCGAGACTCCGTAAAAA-3' 5'-TACAACAAAATGCTTACG-3'	129	53°C
D16S752	16q21	5'-AATTGCGGTATATCTCTGTCTG-3' 5'-GATTGGAGGGGTTGATTCT-3'	101-129	63°C
D17S250	17q11	5'-GGAAGATCAATAGACAAT-3' 5'-GCTGGCCATATATATTAACC-3'	151	51°C
D17S849	17p13	5'-CAATTCTGTTCAAGATTATTTGG-3' 5'-CTCTGGCTGAGGAGGC-3'	251-261	59°C
D17S1828	17p13	5'-TGCCTCAGAGTTGCC-3' 5'-TTAGCCAGTTGGATTGG-3'	207-227	51°C
D17S675	17p13	5'-CCAGGTGATGACACATGCT-3' 5'-GTAGGCAGGTCAAGGTCTAGGG-3'	193	56°C
D17S729	17p13	5'-GGGCATGCCAGCGAGACTCTG-3' 5'-ATATTAGGAGGCCAACAGTCC-3'	138	63°C
D17S1843	17p11	5'-AATCAAGGCTAAAAGCAAA-3' 5'-GAGATCCTGAAACCCG-3'	159-203	53°C
D17S976	17p11	5'-ATATGCCCAACACCTGGTT-3' 5'-TGTGATCATGCTGTAGTCC-3'	234	55°C
D22S303	22q11	5'-AGGACCTCAGACTGGTCACTG-3' 5'-CTCCATGAGGAGGTACCTCC-3'	220-233	62°C
D22S257	22q11	5'-AGCTGATAACCACTCTTGA-3' 5'-GACAGAAATATCTTCCAT-3'	125	51°C
D22S449	22q11	5'-CACTGTGCTCCCAACC-3' 5'-TATCAGCTGTGAGATTGC-3'	200	55°C
D22S258	22q12	5'-GCTGAAATATTCCAGCTG-3' 5'-AATAGTAGATTGCTTTC-3'	177-184	53°C
D22S1163	22q12	5'-AAAAATCAAGGTCAAGCTC-3' 5'-ACAATGTGTGCTGTGC-3'	147-163	51°C
D22S535	22q12	5'-CCATGGATGCTGTCTCA-3' 5'-AGGCATAGGCTGCTAGCC-3'	114	51°C
D22S298	22q12	5'-CTCTTAGGGACAGGTTCC-3' 5'-GAATCTCTCTGATCTGTGC-3'	111	59°C
D22S1150	22q12	5'-GGAACAGTTTGTGCCCC-3' 5'-CAGGCTTATACCAGACC-3'	213-235	51°C
D22S268	22q12	5'-TAGTCTTCAAAATCCAGCT-3' 5'-CTGAGGTGGAGGATTAC-3'	244-251	59°C

Tabela 5. Charakterystyka zastosowanych starterów oligonukleotydowych





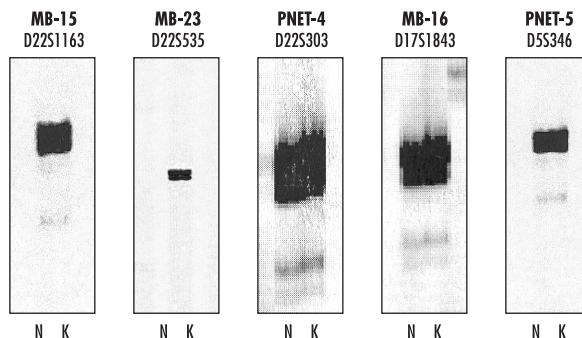
Rys. 2. Schematyczne przedstawienie wyników uzyskiwanych podczas analizy na obecność utraty heterozygotyczności. N – materiał nowotworowy, K – materiał kontrolny

ko regionu genu *PTEN*. Jedyny przypadek sPNET wykazał LOH dla D10S1709 i D10S209 (*SUFU*, *PTEN*), podczas gdy obszar obejmujący gen *DMBT1* cechowało zachowanie heterozygotyczności (tab. 7).

LOH obejmującą długie ramię chromosomu 9, gdzie położony jest gen *PTCH1*, stwierdzono w 2 przypadkach (MB-5, MB-8). Zmiany pod postacią utraty heterozygotyczności obejmujące chromosomy 9q i 10q w 6/7 przypadków współistniały z delecją chromosomu 17p.

Utratę materiału genetycznego na długim ramieniu chromosomu 22 wykazano w pięciu przypadkach (rdzeniak, dwa sPNET i dwa AT/RT). Obszar z delecją we wszystkich przypadkach obejmował locus genu *hSNF5/INI1*. W jednym z przypadków AT/RT (ATRT-1), niewielki obszar, gdzie miała miejsce delecja, obejmował tylko region genu *hSNF5/INI1*, przy zachowaniu heterozygotyczności dla loci D22S303, D22S257 i D22S298 (tab. 8).

W żadnym przypadku nie stwierdzono LOH na chromosomach 1p, 1q i 5q.



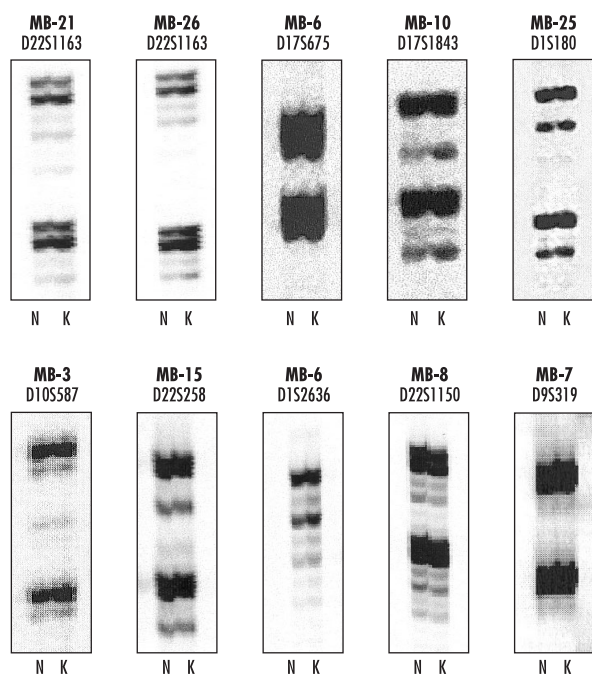
Rys. 3. Przykładowe wyniki uzyskane dla prób homozygotycznych względem badanych loci. N – materiał nowotworowy, K – materiał kontrolny

### UTRATA MATERIAŁU GENETYCZNEGO W NOWOTWORACH NAWROTOWYCH

Badany materiał obejmował 12 przypadków nowotworów nawrotowych. Wśród nich było 7 rdzeniaków pochodzących od różnych chorych, 4 kolejne wznovy sPNET pochodzące od tego samego pacjenta oraz 1 przypadek wznovy AT/RT. Nowotwory te operowane były od 2 do 5 lat po pierwszym zabiegu; we wszystkich przypadkach potwierdzono pierwotne rozpoznania. W analizowanych nowotworach nawrotowych znany był profil molekularny nowotworu pierwotnego. Zmianę obrazu molekularnego stwierdzono w jednym rdzeniaku (MB-9). Był to przypadek nowotworu pierwotnie rozsianego, który po dwóch latach manifestował się jako lita masa nowotworowa zlokalizowana w robaku mózdzku. W nowotworze pierwotnym obecna była utrata heterozygotyczności na chromosomie 10q i 17p, zmiana która uzyskała

Lokalizacja/Marker	Gen	MB-1	MB-4	MB-7	MB-8	MB-9	MB-11	MB-13	MB-14	MB-15	MB-16	MB-17	MB-19	MB-21	MB-22	PNET-3	Częstość LOH
17p13/ D17S849		•	–	•	•	–	•	•	•	–	•	•	○	•	•	•	11/25 (44%)
17p13/ D17S1828		–	•	–	•	•	–	•	•	•	–	–	○	•	•	•	9/22 (41%)
17p13/ D17S675	<i>HIC-1</i>	•	•	•	•	•	–	–	•	•	•	•	○	•	–	–	10/26 (38%)
17p13/ D17S729	<i>REN</i>	–	•	•	–	–	–	–	–	–	•	•	–	–	•	–	5/11 (45%)
17p11/ D17S1843		–	•	–	–	•	–	•	•	–	–	•	•	○	–	–	6/18 (33%)
17p11/ D17S976	<i>TP53</i>	•	–	•	•	–	•	–	•	•	–	–	•	○	•	–	8/20 (40%)

Tabela 6. Szczegółowe wyniki oceny obecności utraty heterozygotyczności na chromosomie 17p z uwzględnieniem lokalizacji wybranych genów objętych analizą mikrosatelitarną. „•” – utrata heterozygotyczności, „○” – heterozygota, „–” – homozygota



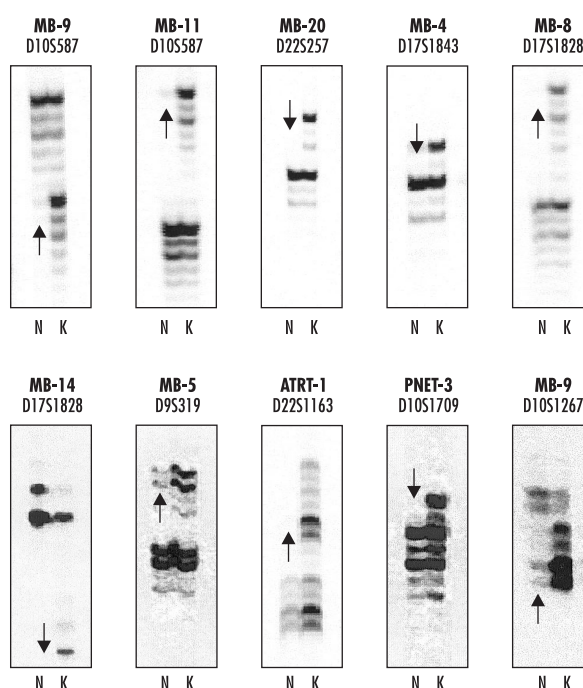
Rys. 4. Przykładowe wyniki ukazujące zachowanie heterozygotyczności. N – materiał nowotworowy, K – materiał kontrolny

potwierdzenie także we wznowie, natomiast tylko w nowotworze nawrotowym stwierdzono dodatkowo utratę na obydwu ramionach chromosomu 16.

Przykładowe wyniki pokazano na rysunkach (rys. 3-5).

## DYSKUSJA

W nowotworach pochodzenia zarodkowego zaburzenia molekularne pod postacią utraty heterozygotyczności występują z różną częstością i dotyczą wielu obszarów chromosomalnych. W rdzeniakach najczęściej stwierdza się utratę ramienia 17p. Zaburzenie to, wykrywane w 30-50% badanych guzów, zazwyczaj jest związane z występowaniem izochromosomu 17q<sup>(14,15,16,17)</sup>. W ana-



Rys. 5. Przykładowe wyniki ukazujące utratę heterozygotyczności. N – materiał nowotworowy, K – materiał kontrolny. Strzałka wskazuje miejsce po utracenym allele

lizowanej grupie nowotworów LOH na chromosomie 17p została potwierdzona w 58% rdzeniaków, co było porównywalne z danymi z piśmiennictwa. Przeprowadzenie badań ze starterem dla sekwencji mikrosatelitarnych umiejscowionych na długim ramieniu chromosomu 17q pośrednio pozwoliło na ustalenie liczby nowotworów, w których możliwa była obecność i(17q). Zachowanie heterozygotyczności dla sekwencji położonych w tym obszarze stwierdzono w 20 przypadkach. Można zatem założyć, że w większości badanych rdzeniaków utracie materiału genetycznego na chromosomie 17p towarzyszyła obecność izochromosomu 17q. Istnieją dwie hipotezy tłumaczące znaczenie zmian obejmujących

Lokalizacja/Marker	Gen	MB-9	MB-11	MB-16	MB-22	PNET-3	Częstość LOH
10q23/ D10S1709	<i>PTEN</i>	•	–	•	•	•	4/27 (15%)
10q23/ D10S1267	<i>SUFU</i>	•	–	○	–	–	1/25 (4%)
10q26/ D10S209		–	•	○	•	•	3/25 (12%)
10q26/ D10S587	<i>DMBT1</i>	•	•	○	–	○	2/23 (7%)

Tabela 7. Szczegółowe wyniki oceny obecności LOH na chromosomie 10q z uwzględnieniem lokalizacji wybranych genów objętych analizą mikrosatelitarną. „•” – utrata heterozygotyczności, „○” – heterozygota, „–” – homozygota

chromosom 17 w patogenezie rdzenia. Jedną z nich zakłada, że dla rozwoju nowotworu istotną jest nie tylko utrata materiału genetycznego na ramieniu krótkim, ale również związany z obecnością i(17q) nadmiar materiału genetycznego na ramieniu długim chromosomu 17<sup>(16,18,19)</sup>. Drugą hipotezę, mającą zdecydowanie więcej zwolenników, opiera się na założeniu, że tracony obszar na chromosomie 17p zawiera hipotetyczne geny supresorowe. Poszukiwania tych genów nie ustają od momentu stwierdzenia, jak częstą zmianą jest utrata ramienia krótkiego 17p w rdzeniakach. Minimalny region 17p ulegający w rdzeniakach delecji obejmuje obszar 17p13.3-13.2<sup>(20-23)</sup>. Analizy molekularne położonych w tym regionie znanych genów supresorowych nie wykazują częstych zmian. Przykładem jest gen *TP53*, którego mutacje stwierdza się u około 50% wszystkich schorzeń nowotworowych u człowieka, a w rdzeniakach mutacje genu potwierdzono w zaledwie kilku przypadkach<sup>(18,24,25)</sup>. Poszukiwania zaburzeń genów supresorowych na chromosomie 17p nie ograniczają się tylko do znanych anty-onkogenów, lecz na podstawie wyników prezentowanych w większości opracowań trudno o spójne wnioski. Dotyczy to m.in. genów *ROX/Mnt*, *HIC-1* oraz *ABR*<sup>(20,23,26-30)</sup>. Jedynie w przypadku genu *REN<sup>KCTD11</sup>* odsetek stwierdzanych zmian wydaje się być większy<sup>(31,32)</sup>. W materiale własnym utratę całego ramienia 17p odnotowano

w 12 z 14 rdzeniaków z LOH 17p. Podobne wyniki prezentują Thomas i wsp. oraz Scheurlen i wsp., którzy w przeprowadzonych badaniach potwierdzili utratę całego krótkiego ramienia 17p we wszystkich badanych przypadkach<sup>(33,34)</sup>. Po porównaniu uzyskanych wyników z aktualną literaturą wydaje się, że zmiany na chromosomie 17 świadczą o obecności większej liczby genów supresorowych położonych na krótkim ramieniu 17p, które mogą być zaangażowane w patogenezę rdzenia. Niepowodzenia przy poszukiwaniu tych genów powinny jednakże skłaniać ku jednej z opisanych powyżej hipotez, podkreślających prawdopodobne znaczenie zmian ilościowych obejmujących chromosom 17 w patogenezie rdzenia.

W nowotworach typu sPNET w odróżnieniu od rdzeniaków nie opisywano dotychczas zmian o typie utraty materiału genetycznego na długim ramieniu chromosomu 17. Zaburzenie to uznawane jest za główny element różnicujący na poziomie molekularnym oba typy podobnych do siebie histologicznie nowotworów. Stwierdzenie w jednym z przypadków w analizowanym materiale obecności LOH na 17p jest dowodem na możliwość występowania tego zaburzenia także w nowotworach o typie sPNET. Brak opisu takich zmian w piśmiennictwie można wytłumaczyć ich prawdopodobnie małą częstością występowania oraz umieszczeniem obu typów

Lokalizacja/Marker	Gen	MB-20	PNET-1	PNET-4	ATRT-1	ATRT-3	Częstość LOH
22q11/ D22S303		•	•	–	○	•	3/18 (17%)
22q11/ D22S257		•	–	–	○	–	1/19 (5%)
22q11/ D22S449	<i>hSNF5/INI1</i>	–	–	•	–	•	2/21 (9%)
22q12/ D22S258		–	•	•	–	–	2/20 (10%)
22q12/ D22S1163		•	•	•	•	–	4/25 (16%)
22q12/ D22S535		–	–	–	–	–	0/9 (0%)
22q12/ D22S298		–	○	–	○	•	1/18 (6%)
22q12/ D22S1150		•	–	–	–	–	1/16 (6%)
22q12/ D22S268		•	○	•	–	•	3/13 (23%)

Tabela 8. Szczegółowe wyniki oceny obecności LOH na chromosomie 22q z uwzględnieniem lokalizacji wybranych genów objętych analizą mikrosatelitarną. „•” – utrata heterozygotyczności, „○” – heterozygota, „–” – homozygota



nowotworów w jednej grupie, co miało miejsce zwłaszcza w starszych doniesieniach.

W rdzeniakach obecność LOH na chromosomie 17p (współlistniejąca najczęściej z izochromosomem 17q) opisywana jest także w skojarzeniu z innymi aberracjami chromosomalnymi, mającymi charakter nadmiaru materiału genetycznego. Bayani i wsp. oraz Bhattacharjee i wsp. na podstawie analiz cytogenetycznych wymieniają wśród tych zmian trisomię chromosomu 7 oraz nadmiar materiału genetycznego na chromosomach 1 i 8<sup>(5,35)</sup>. Wyniki analiz przeprowadzonych przez Reardon i wsp., Avet-Loiseau i wsp., Shlomit i wsp. oraz Michiels i wsp. metodą CGH wykazały współobecność zmian o podobnym charakterze<sup>(4,36,37,38)</sup>. W badaniach tych zauważyć można także obecność licznych kombinacji zmian o charakterze utraty materiału genetycznego występujących w obrębie różnych chromosomów, generalnie jednak brak im cech powtarzalności. Również w analizach przeprowadzonych przy użyciu markerów mikrosatelitarnych nie wykazano jak dotąd takiej zależności. W opracowaniu Blaeker i wsp. obejmującym 7 przypadków rdzeniaków kombinacje zaburzeń mających miejsce w obszarach położonych na różnych chromosomach miały charakter przypadkowych zmian wtórnych<sup>(39)</sup>.

Analiza materiału własnego wykazała współwystępowanie LOH na chromosomie 17p z zaburzeniami tego typu na krótkich ramionach chromosomów 9 i 10. Badane obszary na tych chromosomach obejmowały *loci* dla genów zaangażowanych w proces przekazywania sygnału na szlaku SHH: *SUFU* i *PTCH1*. Zaburzenia w obrębie tych genów opisywano dotychczas przede wszystkim w odmianie desmoplastycznej rdzeniaka<sup>(33,40)</sup>. W jedynym analizowanym przypadku tej postaci nowotworu (MB-20) nie stwierdzono LOH na 9q i 10q. Natomiast zbieżność obecności LOH na 9q, 10q i 17p może przemawiać za związkiem pomiędzy genami aktywnymi na szlaku SHH i genami zlokalizowanymi na krótkim ramieniu chromosomu 17, także w klasycznej postaci rdzeniaka. Potwierdzeniem tych spostrzeżeń może być doniesienie Di Marcotullino i wsp. opisujące delecje genu supresorowego *REN<sup>KCTD11</sup>* w 39% (7/18) badanych rdzeniaków<sup>(32)</sup>. Powyższy gen, będący antagonistą białek transkrypcyjnych z rodziny Gli, poprzez blokowanie ich transferu do wnętrza jądra wycisza transkrypcję genów docelowych. Inaktywacja genu prowadzi do zaburzeń w funkcjonowaniu szlaku SHH i przyczynia się do promocji rozrostu nowotworowego. W kolejnej pracy pochodzącej z tego samego ośrodka De Smaele i wsp. kolejny raz podkreślili znaczenie delecji na chromosomie 17p w aktywacji transkrypcji docelowych genów na szlaku SHH<sup>(31)</sup>. Odkrycie zmian genu *REN<sup>KCTD11</sup>* ponownie skłania do podjęcia próby wyjaśnienia znaczenia częstego zaburzenia, jakim jest utrata chromosomu 17p w patogenezie rdzeniaka. Ponieważ utrata materiału genetycznego na chromosomie 17 jest najczęstszą zmianą molekularną stwierdzaną w rdzeniaku, w wielu doniesieniach podejmowano pró-

by wykorzystania jej jako czynnika prognostycznego. W chwili obecnej brak jest jednak przesłanek, które pozwalałyby na jednoznaczną interpretację danych z piśmiennictwa. Bowiem obok prac Batra i wsp. czy Scheurlen i wsp., w których opisano związek pomiędzy utratą chromosomu 17p a zdecydowanie gorszym rokowaniem w porównaniu z chorymi bez delecji, istnieją doniesienia, których autorzy na podstawie przeprowadzonych analiz statystycznych stawiają krątcowo odmienne wnioski<sup>(19,41)</sup>. I tak Emadian i wsp., Biegel i wsp. a także Jung i wsp. nie wykazali zależności pomiędzy LOH 17p a krótszym czasem przeżycia chorych<sup>(14,42,43)</sup>. Należy nadmienić, że w większości wspomnianych opracowań, poza pracą Biegel i wsp. opartą na większej, bo 56-osobowej grupie pacjentów, liczebność badanych grup jest porównywalna. Sposobem na wykorzystanie LOH 17p jako czynnika prognostycznego może być rozwiązanie zaproponowane przez Gilbertson i wsp., w którym powiązано utratę ramienia krótkiego ze zmianami ekspresji receptora ErbB2 oraz z klinicznymi czynnikami ryzyka. Zdaniem autorów posunięcie takie pozwala na zdecydowanie lepsze przewidywanie przebiegu choroby<sup>(17)</sup>.

Zarówno Emadian i wsp., jak i Biegel i wsp. zwracają uwagę na częstsze występowanie LOH 17p u dzieci powyżej trzeciego roku życia<sup>(14,42)</sup>. W obu doniesieniach grupa młodszych dzieci stanowiła około 1/4 wszystkich badanych, przy czym autorzy nie stwierdzili statystycznie istotnej zależności pomiędzy wiekiem chorych a czasem ich przeżycia, nie wykazując tym samym związku pomiędzy utratą krótkiego ramienia chromosomu 17p a gorszym rokowaniem. Podobne wyniki dotyczące częstości LOH na 17p w poszczególnych grupach wiekowych uzyskano także w wyniku analizy materiału własnego.

Utrata materiału genetycznego na chromosomie 22q opisywana jest, w zależności od opracowania, w 7-27% dla nowotworów MB/SPNET i w 60-90% dla AT/RT<sup>(35,44,45,46)</sup>. W materiale własnym LOH na 22q została potwierdzona w 3 przypadkach MB/SPNET (14%) i w 2 z 3 badanych AT/RT. Częstość występowania tych zmian pozostaje w zgodzie z danymi z piśmiennictwa. LOH na chromosomie 22q była jedynym stwierdzonym zaburzeniem o typie utraty materiału genetycznego w AT/RT. Nie odnotowano obecności utraty materiału genetycznego w obrębie innych obszarów genomu opisywanych przez Wharton i wsp. i Rickert i wsp. W pracach tych autorzy przeanalizowali metodą CGH łącznie 10 przypadków guzów AT/RT, wykazując współistnienie utraty materiału genetycznego na chromosomie 22 z utratą na chromosomach 1, 16, 17, 19 i 20<sup>(47,48)</sup>.

Utrata materiału genetycznego na 22q w nowotworach MB/SPNET jest uznawana powszechnie za zmianę wtórną, opisywaną w kombinacjach z innymi alteracjami, przede wszystkim zaś z izochromosomem 17q<sup>(5,49,50)</sup>. Jednak w materiale własnym, podobnie jak miało to miejsce w przypadkach guzów AT/RT, zaburzenie to występowało jako zmiana izolowana.

Utrata materiału genetycznego na chromosomie 1, obecna w wielu typach nowotworów OUN, w rdzeniakach jest opisywana z częstością 30-40%<sup>(51-55)</sup>. Mutacje jedyne go kandydata położonego w tej okolicy, genu *PTCH2*, stwierdza się wyjątkowo rzadko<sup>(56)</sup>. Co ciekawe, odmienne wyniki uzyskiwane są przy użyciu metody CGH. Strata krótkiego ramienia chromosomu 1p notowana jest sporadycznie, natomiast częstym zaburzeniem jest nadmiar materiału genetycznego na 1q<sup>(36,57)</sup>. Utrata materiału genetycznego na chromosomie 1 w nowotworach sPNET i AT/RT opisywana była w pojedynczych przypadkach, jednak mała liczebność badanych grup nie pozwala na obiektywną ocenę częstości tego zjawiska<sup>(6,44,48,58)</sup>. W materiale własnym nie stwierdzono jej w żadnym z nowotworów pochodzenia zarodkowego. Wyniki potwierdzające zachowanie heterozygotyczności we wszystkich analizowanych przypadkach są poważną przesłanką do zakwestionowania badanego regionu jako miejsca obejmującego geny supresorowe transformacji nowotworowej istotne dla rozwoju nowotworów pochodzenia zarodkowego u dzieci.

W materiale własnym nie wykryto także obecności delekcji na chromosomie 5q, obejmujących region genu *APC*, opisywanych w pojedynczych przypadkach w literaturze. Zaburzenia tego genu spotyka się przede wszystkim w rdzeniakach, których występowanie uwarunkowane jest genetycznie (zespół Turcota typu 2), natomiast badana grupa obejmowała tylko przypadki nowotworów występujących sporadycznie<sup>(21,37,59)</sup>.

Informacje na temat progresji i/lub sekwencji pojawiania się zmian molekularnych w nowotworach mózgu pochodzenia zarodkowego są nieliczne i dotyczą w zasadzie tylko rdzeniaków. Spośród kilku analiz uwzględniających także nowotwory nawrotowe, zmiany w obrazie molekularnym guzów pierwotnych i wtórnych opisali tylko Eberhart i wsp.<sup>(60)</sup> W pracy udokumentowano dodatkową utratę materiału genetycznego na chromosomach 17p i Y w guzie nawrotowym, przy czym wraz ze zmianą obrazu molekularnego nastąpiła progresja stopnia anaplazji nowotworu. Zjawisko zmiany stopnia anaplazji opisali także Loenard i wsp., ale w analizowanym materiale nie było rdzeniaków. Autorzy scharakteryzowali natomiast związek pomiędzy obecnością większej liczby zmian molekularnych w grupie nowotworów o wyższym stopniu anaplazji i na podstawie przeprowadzonych analiz uznali obecność i(17q) za zmianę pojawiającą się we wczesnej fazie rozwoju nowotworu<sup>(61)</sup>. Hipoteza dotycząca jednoczesnej zmiany stopnia anaplazji rdzeniaków i ich obrazu molekularnego stawiana jest także w kolejnym doniesieniu Eberhart i Burger. Autorzy uważają, że związek pomiędzy wznową nowotworu a progresją stopnia jego anaplazji, połączoną z nagromadzeniem się aberracji genetycznych, może dotyczyć nie tylko rdzeniaków, ale także innych nowotworów pochodzenia zarodkowego<sup>(60,62)</sup>.

W jedynej analizie przeprowadzonej przy użyciu markerów mikrosatelitarnych autorstwa Yin i wsp. nie wyka-

zano zmian w obrazie zaburzeń molekularnych stwierdzanych w dwóch rdzeniakach nawrotowych<sup>(11)</sup>. Analiza materiału własnego obejmująca siedem przypadków nowotworów nawrotowych (pięć rdzeniaków, jeden sPNET, jeden AT/RT) potwierdziła progresję zmian molekularnych w jednym z badanych nowotworów. Przypadek ten dotyczył 6-letniego dziecka z pierwotnie rozsianą postacią rdzeniaka obejmującego cały tylny dół czaszki, który poddany został radioterapii i chemioterapii. Po dwóch latach u chorego stwierdzono symptomy wznowy procesu nowotworowego pod postacią litego guza zlokalizowanego w robaku mózdzku.

Analiza molekularna nowotworu nawrotowego, oprócz notowanych w procesie pierwotnym delekcji na chromosomach 10q i 17p, wykazała dodatkową utratę materiału genetycznego na obydwu ramionach chromosomu 16. W badaniu histopatologicznym w obu przypadkach rozpoznano rdzeniaka klasycznego. Dodatkowy obszar objęty delekcją zajmował w nowotworze nawrotowym lokalizacje, których utratę opisywali m.in. Blaeker i wsp., Yin i wsp. oraz Michiels i wsp.<sup>(11,36,39)</sup> Te dosyć częste, bo występujące nawet w 50% przypadków, zmiany nie były dotąd opisywane jako zaburzenia wtórne, nawet we wspomnianej wcześniej analizie Yin i wsp.<sup>(11)</sup>

Studiując ten przypadek, nie można wykluczyć możliwości pojawienia się nowych zmian molekularnych w wyniku stosowanej radioterapii, która w rdzeniaku jest metodą terapeutyczną z wyboru. Jednakże argumentem przemawiającym przeciwko temu założeniu jest brak progresji zmian molekularnych w pozostałych analizowanych przypadkach nowotworów nawrotowych, z których większość (7 spośród 9) guzów także była poddana radioterapii i chemioterapii.

Uzyskane wyniki nie wykazały zatem częstego występowania dodatkowych regionów objętych utratą materiału genetycznego w nowotworach nawrotowych. Niemniej jednak progresja procesu nowotworowego może być związana z obecnością innych zmian molekularnych, co sugerowali Leonard i wsp., wykazując częstsze amplifikacje *c-myc* w rdzeniakach olbrzymiokomórkowych uważanych za nowotwory o bardziej nasilonej anaplazji<sup>(61)</sup>.

## WNIOSKI

1. Stwierdzenie utraty heterozygotyczności w regionach obejmujących miejsca lokalizacji znanych genów supresorowych: *PTCH1*, *AXIN1*, *hSNF5/IN11*, *PTEN*, *SUFU* i *DMBT1* przemawia pośrednio za ich zaangażowaniem w patogenezę nowotworów pochodzenia zarodkowego.
2. Odnotowanie utraty heterozygotyczności na chromosomach 16 i 17 sugeruje obecność w tych obszarach *loci* dla dotychczas niezidentyfikowanych genów supresorowych transformacji nowotworowej.
3. Brak zmian wskazujących na utratę materiału genetycznego na chromosomach 1 i 5 przemawia za

ich niewielkim znaczeniem w rozwoju badanych nowotworów.

4. Badania przy użyciu markerów mikrosatelitarnych ze względu na rozmiar delecji często nie pozwalają na określenie minimalnego traconego regionu i uniemożliwiają precyzyjne oznaczenie *loci* poszczególnych genów supresorowych.
5. Zaburzenia molekularne występują z różną częstością w poszczególnych typach histologicznych nowotworów pochodzenia zarodkowego, nie mają jednak charakteru zmian swoistych.
6. Progresja zmian molekularnych w nowotworach narządowych jest możliwa, aczkolwiek nie wydaje się być zjawiskiem częstym. Nie można równocześnie wykluczyć wpływu radioterapii na powstawanie kolejnych zaburzeń.

#### PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

1. Gatta G., Capocaccia R., Coleman M.P. i wsp.: Childhood cancer survival in Europe and the United States. *Cancer* 2002; 95: 1767-1772.
2. Roberts R.O., Lynch C.F., Jones M.P., Hart M.N.: Medulloblastoma: a population-based study of 532 cases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1991; 50: 134-144.
3. Kleihues P., Cavenee W.K.: Pathology and genetics of tumors of the nervous system. IARC Press, Lyon 2000.
4. Avet-Loiseau H., Venaut A.M., Terrier-Lacombe M.J. i wsp.: Comparative genomic hybridization detects many recurrent imbalances in central nervous system primitive neuroectodermal tumours in children. *Br. J. Cancer* 1999; 79: 1843-1847.
5. Bayani J., Zielenska M., Marrano P. i wsp.: Molecular cytogenetic analysis of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumours by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping. *J. Neurosurg.* 2000; 93: 437-448.
6. Bigner S.H., McLendon R.E., Fuchs H. i wsp.: Chromosomal characteristics of childhood brain tumours. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1997; 97: 125-134.
7. Dahmen R.P., Koch A., Denkhau D. i wsp.: Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res.* 2001; 61: 7039-7043.
8. Huang H., Mahler-Araujo B.M., Sankila A. i wsp.: APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 433-437.
9. Pomeroy S.L., Tamayo P., Gaasenbeek M. i wsp.: Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 2002; 415: 436-442.
10. Russo C., Pellarin M., Tingby O. i wsp.: Comparative genomic hybridization in patients with supratentorial and infratentorial primitive neuroectodermal tumours. *Cancer* 1999; 86: 331-339.
11. Yin X.L., Pang J.C., Liu Y.H. i wsp.: Analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 10q, 11, and 16 in medulloblastomas. *J. Neurosurg.* 2001; 94: 799-805.
12. Yokota N., Nishizawa S., Ohta S. i wsp.: Role of Wnt pathway in medulloblastoma oncogenesis. *Int. J. Cancer* 2002; 101: 198-201.
13. Thiagalingam S., Laken S., Willson J.K.V. i wsp.: Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98: 2698-2702.
14. Biegel J.A., Janss A.J., Raffel C. i wsp.: Prognostic significance of chromosome 17p deletions in childhood primitive neuroectodermal tumours (medulloblastomas) of the central nervous system. *Clin. Cancer Res.* 1997; 3: 473-478.
15. Albrecht S., von Deimling A., Pietsch T. i wsp.: Microsatellite analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 9q, 11p and 17p in medulloblastomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1994; 20: 74-81.
16. Burnett M.E., White E.C., Sih S. i wsp.: Chromosome arm 17p deletion analysis reveals molecular genetic heterogeneity in supratentorial and infratentorial primitive neuroectodermal tumours of the central nervous system. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1997; 97: 25-31.
17. Gilbertson R., Wickramasinghe C., Hernan R. i wsp.: Clinical and molecular stratification of disease risk in medulloblastoma. *Br. J. Cancer.* 2001; 85: 705-712.
18. Burns A.S., Jaros E., Cole M. i wsp.: The molecular pathology of p53 in primitive neuroectodermal tumours of the central nervous system. *Br. J. Cancer* 2002; 86: 1117-1123.
19. Scheurlen W.G., Schwabe G.C., Seranski P. i wsp.: Mapping of the breakpoints on the short arm of chromosome-17 in neoplasms with an i (17q). *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25: 230-240.
20. Steichen-Gersdorf E., Baumgartener M., Kreczy A. i wsp.: Deletion mapping on chromosome 17p in medulloblastoma. *Br. J. Cancer* 1997; 76: 1284-1287.
21. Biegel J., Burk C.D., Barr F.G., Emanuel G.S.: Evidence for a 17p tumour related locus distinct from p53 in paediatric primitive neuroectodermal tumours. *Cancer Res.* 1992; 52: 3391-3395.
22. Cogen P.H.: Prognostic significance of molecular genetic markers in childhood brain tumours. *Pediatr. Neurosurg.* 1991-92; 17: 245-250.
23. McDonald J.D., Daneshvar L., Willert J.R. i wsp.: Physical mapping of chromosome 17p13.3 in the region of a putative tumour suppressor gene important in medulloblastoma. *Genomics* 1994; 23: 229-232.
24. Felix C.A., Slave I., Dunn M. i wsp.: p53 gene mutations in paediatric brain tumours. *Med. Pediatr. Oncol.* 1995; 25: 431-436.
25. Phelan C.M., Liu L., Rutledge M.H. i wsp.: Chromosome 17 abnormalities and lack of TP53 mutations in paediatric central nervous system tumours. *Hum. Genet.* 1995; 96: 684-690.
26. Cvekl A. Jr, Zavadil J., Birshstein B.K. i wsp.: Analysis of transcripts from 17p13.3 in medulloblastoma suggests ROX/MNT as a potential tumour suppressor gene. *Eur. J. Cancer* 2004; 40: 2525-2532.
27. Sommer A., Waha A., Tonn J. i wsp.: Analysis of the Max-binding protein MNT in human medulloblastomas. *Int. J. Cancer* 1999; 82: 810-816.
28. Rood B.R., Zhang H., Weitman D.M., Cogen P.H.: Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma. *Cancer Res.* 2002; 62: 3794-3797.
29. Waha A., Waha A., Koch A. i wsp.: Epigenetic silencing of the HIC-1 gene in human medulloblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003; 62: 1192-1201.
30. Waha A., Koch A., Hartmann W. i wsp.: Analysis of HIC-1 methylation and transcription in human ependymomas. *Int. J. Cancer* 2004; 110: 542-549.
31. De Smaele E., Di Marcotullio L., Ferretti E. i wsp.: Chromosome 17p deletion in human medulloblastoma: a missing checkpoint in the Hedgehog pathway. *Cell Cycle* 2004; 3: 1263-1266.



32. Di Marcotullio L., Ferretti E., De Smaele E. i wsp.: REN (KCTD11) is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101: 10833-10838.
33. Scheurlen W.G., Seranski P., Mincheva A. i wsp.: High-resolution deletion mapping of chromosome arm 17p in childhood primitive neuroectodermal tumours reveals a common chromosomal disruption within the Smith-Magenis region, an unstable region in chromosome band 17p11.2. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 18: 50-58.
34. Thomas G.A., Raffel C.: Loss of heterozygosity on 6q, 16q and 17p in human central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* 1991; 51: 639-643.
35. Bhattacharjee M.B., Armstrong D.D., Vogel H. i wsp.: Cytogenetic analysis of 120 primary paediatric brain tumours and literature review. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1997; 97: 39-53.
36. Michiels E.M., Weiss M.M., Hoovers J.M. i wsp.: Genetic alterations in childhood medulloblastoma analysed by comparative genomic hybridization. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2002; 24: 205-210.
37. Reardon D.A., Michalkiewicz E., Boyett J.M. i wsp.: Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 1997; 57: 4042-4047.
38. Shlomit R., Ayala A.G., Michal D. i wsp.: Gains and losses of DNA sequences in childhood brain tumours analysed by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2000; 121: 67-72.
39. Blacker H., Rasheed B.K., McLendon R.E. i wsp.: Microsatellite analysis of childhood brain tumours. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 15: 54-63.
40. Rubin J.B., Rowitch D.H.: Medulloblastoma: a problem of developmental biology. *Cancer Cell* 2002; 2: 7-8.
41. Batra S.K., McLendon R.E., Koo J.S. i wsp.: Prognostic implications of chromosome 17p deletions in human medulloblastomas. *J. Neurooncol.* 1995; 24: 39-45.
42. Emadian S.M., McDonald J.D., Gerken S.C., Fults D.: Correlation of chromosome 17p loss with clinical outcome in medulloblastoma. *Clin. Cancer Res.* 1996; 2: 1559-1564.
43. Jung H.L., Wang K.C., Kim S.K. i wsp.: Loss of heterozygosity analysis of chromosome 17p. 13.1-13.3 and its correlation with clinical outcome in medulloblastomas. *J. Neurooncol.* 2004; 67: 41-46.
44. Biegel J.A., Fogelgren B., Zhou J.Y. i wsp.: Mutations of the INI1 rhabdoid tumour suppressor gene in medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumours of the central nervous system. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 2759-2763.
45. Biegel J.A., Tan L., Zhang F. i wsp.: Alterations of the hSNF5/INI1 gene in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumours and renal and extrarenal rhabdoid tumours. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 3461-3467.
46. Sevenet N., Lellouch-Tubiana A., Schoefield D. i wsp.: Spectrum of hSNF5/INI1 somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8: 2359-2368.
47. Rickert C.H., Paulus W.: Chromosomal imbalances detected by comparative genomic hybridisation in atypical teratoid/rhabdoid tumours. *Child's Nerv. Syst.* 2004; 20: 221-224.
48. Wharton S.B., Wardle C., Ironside J.W. i wsp.: Comparative genomic hybridisation and pathological findings in atypical teratoid/rhabdoid tumour of the central nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2003; 29: 254-261.
49. Biegel J.A., Rorke L.B., Packer R.J. i wsp.: Isochromosome 17q in primitive neuroectodermal tumours of the central nervous system. *Genes Chromosomes Cancer* 1989; 1: 139-147.
50. Biegel J.A., Zhou J.Y., Rorke L.B. i wsp.: Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumours. *Cancer Res.* 1999; 59: 74-79.
51. Ahuja N., Mohan A.L., Li Q. i wsp.: Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1997; 57: 3370-3374.
52. Bello M.J., Leone P.E., Nebreda P. i wsp.: Allelic status of chromosome 1 in neoplasms of the nervous system. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1995; 83: 160-164.
53. Kraus J.A., Koch A., Albrecht S. i wsp.: Loss of heterozygosity at locus F13B on chromosome 1q in human medulloblastoma. *Int. J. Cancer* 1996; 67: 11-15.
54. Pietsch T., Koch A., Wiestler O.D.: Molecular genetic studies in medulloblastomas: evidence for tumour suppressor genes at the chromosomal regions 1q31-32 and 17p13. *Klin. Padiatr.* 1997; 209: 150-155.
55. Sulman E.P., White P.S., Brodeur G.M.: Genomic annotation of the meningioma tumour suppressor locus on chromosome 1p34. *Oncogene* 2004; 23: 1014-1020.
56. Smyth I., Narang M.A., Evans T. i wsp.: Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8: 291-297.
57. Agarwala S., Sanders T.A., Ragsdale C.W.: Sonic hedgehog control of size and shape in midbrain pattern formation. *Science* 2001; 291: 2147-2150.
58. Roberts P., Chumas P.D., Picton S. i wsp.: A review of the cytogenetics of 58 paediatric brain tumours. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2001; 131: 1-12.
59. Huang H., Mahler-Araujo B.M., Sankila A. i wsp.: APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 433-437.
60. Eberhart C.G., Kratz J.E., Schuster A. i wsp.: Comparative genomic hybridization detects an increased number of chromosomal alterations in large cell/anaplastic medulloblastomas. *Brain Pathol.* 2002; 12: 36-44.
61. Leonard J.R., Cai D.X., Rivet D.J. i wsp.: Large cell/anaplastic medulloblastomas and medulloblastomas: clinicopathological and genetics features. *J. Neurosurg.* 2001; 95: 82-88.
62. Eberhart C.G., Burger P.C.: Anaplasia and grading in medulloblastomas. *Brain Pathol.* 2003; 13: 376-385.