



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## Molekulárně genetická diagnostika high-grade gliomů pediatrického typu

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

**Autor:** Tereza Kalendová

**Vedoucí práce:** RNDr. Lenka Krsková, Ph.D.

České Budějovice 2024

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Molekulárně genetická diagnostika high-grade gliomů pediatrického typu*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29. 4. 2024

.....

podpis

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla věnovat poděkování za odborné vedení této práce, cenné rady, předané zkušenosti, ochotu a trpělivost během zpracování práce RNDr. Lence Krskové, PhD. Zároveň děkuji všem kolegyním a kolegům z Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol za jejich ochotu a odborné rady, které mi při zpracování práce poskytli. Zvláštní poděkování patří pak mým kolegyním z Laboratoře molekulární patologie.

V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým přátelům za neutichající podporu nejen během zpracování této práce, ale během celého bakalářského studia.

# Molekulárně genetická diagnostika high-grade gliomů pediatrického typu

## Abstrakt

Pediatrické high-grade gliomy (HGG) představují závažné onemocnění s vysokou mírou morbidity a mortality u dětí. Genetická diagnostika se stává klíčovým nástrojem pro lepší pochopení patogeneze těchto nádorů a ke zlepšení přežití pacientů s takto infaustní diagnózou. Tato bakalářská práce se zaměřuje na molekulárně genetickou diagnostiku HGG u pediatrických pacientů. Práce začíná přehledem pediatrických HGG a podtrhuje důležitost molekulárně genetického přístupu k jejich studiu. Následuje zhodnocení současných molekulárně genetických technik v diagnostice HGG, a to primárně na analýzu specifických genových mutací. Dále se práce zabývá metodami sběru vzorků, analýzy dat a interpretace výsledků. Důraz je kladen na potenciál molekulárně genetických vyšetření pro predikci prognózy, výběr vhodných terapeutických strategií a sledování pacientů po léčbě. Nakonec jsou diskutovány výzvy a budoucí směry v oblasti molekulární genetické diagnostiky HGG u pediatrických pacientů. Tato práce poskytuje komplexní pohled na význam molekulární genetiky v diagnostice a managementu HGG u dětí a přispívá k rozvoji nových přístupů k léčbě tohoto závažného onemocnění.

## Klíčová slova

Glioblastom; High-grade gliom; Pediatrický high-grade gliom; Molekulárně-genetická diagnostika; Mutace genu *IDH1*; Mutace genu *IDH2*; Mutace genu *H3-3A (H3F3A)*; Mutace genu *H3C2*; Mutace genu *BRAF*; Mutace genu *ACVR1*; Mutace genu *FGFR1*; Sekvenační analýza

# Molecular Genetic Diagnostics of Pediatric high-grade Gliomas

## Abstract

Pediatric high-grade gliomas (HGG) represent a serious disease with high morbidity and mortality rates in children. Genetic diagnostics are becoming a key tool for better understanding the pathogenesis of these tumors and improving their clinical management. This bachelor's thesis focuses on the molecular genetic diagnosis of HGG in pediatric patients. The thesis begins with an overview of pediatric HGG and the importance of a molecular genetic approach to their study. It then evaluates current molecular genetic techniques in the diagnosis of HGG, primarily focusing on the analysis of specific gene mutations. Furthermore, the thesis addresses methods of sample collection, data analysis, and interpretation of results. Emphasis is placed on the potential of molecular genetic diagnostics for predicting prognosis, selecting appropriate therapeutic strategies, and monitoring patients post-treatment. Finally, challenges and future directions in the field of molecular genetic diagnostics of HGG in pediatric patients are discussed. This work provides a comprehensive view of the significance of molecular genetics in the diagnosis and management of HGG in children and contributes to the development of new approaches to treating this serious disease.

## Key words

Glioblastoma; High-grade glioma; Pediatric high-grade glioma; Molecular genetic diagnostics; *IDH1* gene mutation; *IDH2* gene mutation; *H3-3A (H3F3A)* gene mutation; *H3C2* gene mutation; *BRAF* gene mutation; *ACVR1* gene mutation; *FGFR1* gene mutation; Sequencing analysis

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>9</b>
2.1	High-grade gliomy pediatrického typu: charakteristika a epidemiologie.....	9
2.1.1	WHO klasifikace HGG pediatrického typu.....	9
2.1.1.1	Difúzní středočárový gliom (H3 K27-alterovaný, DMG, DIPG).....	10
2.1.1.2	Difúzní hemisférický gliom (H3 G34-alterovaný).....	12
2.1.1.3	Difúzní high-grade gliom dětského typu (H3-wildtype, IDH-wildtype, pHGG)	14
2.1.1.4	Hemisférický gliom infantilního typu.....	16
<b>3</b>	<b>Molekulární patologie high-grade gliomů pediatrického typu</b> .....	<b>19</b>
3.1	Molekulární patologie difúzního středočárového gliomu (H3 K27-alterovaného, DMG, DIPG).....	20
3.1.1	DMG s mutací H3K27M/I.....	20
3.1.2	DMG H3-wildtype s nadměrnou expresí EZHIP .....	21
3.1.3	DMG se změnou EGFR (např. mutace EGFRvIII) .....	21
3.2	Molekulární patologie difúzního hemisférického gliomu (H3 G34-alterovaného).....	22
3.3	Molekulární patologie difúzního gliomu high-grade dětského typu (H3-wildtype, IDH-wildtype, pHGG) .....	22
3.4	Molekulární patologie hemisférického gliomu infantilního typu.....	23
<b>4</b>	<b>Cíle práce a hypotézy</b> .....	<b>24</b>
4.1	Cíle práce .....	24
4.2	Hypotézy.....	24
<b>5</b>	<b>Praktická část</b> .....	<b>25</b>
5.1	Molekulárně genetické vyšetření high-grade gliomů pediatrického typu metodou PCR a Sangerova sekvenování.....	25
5.1.1	Odběr primárních vzorků.....	25
5.1.2	Izolace DNA .....	25
5.1.2.1	Izolace DNA z FFPE vzorků .....	26
5.1.2.2	Izolace DNA z nativní zmražené tkáně .....	28
5.1.3	Měření koncentrace DNA.....	31
5.1.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	32

5.1.4.1	Kontrola kvality DNA pomocí PCR reakce (amplifikace kontrolních genů CTRL) .....	33
5.1.4.2	Vyšetření mutačního stavu genů IDH1, IDH2, H3-3A, H3C2, ACVR1, FGFR1 a BRAF pomocí PCR reakce .....	36
5.1.5	Detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy .....	38
5.1.6	Přečištění PCR produktů.....	41
5.1.7	Sekvenační reakce.....	42
<b>6</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>52</b>
	<b>Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>62</b>
<b>10</b>	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>65</b>
<b>11</b>	<b>Seznam tabulek.....</b>	<b>66</b>
<b>12</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>67</b>

# 1 Úvod

High-grade gliomy (HGG) představují závažné maligní nádory mozku s vysokou mírou morbidity a mortality. Nedávná revize klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) podtrhuje význam molekulárně genetické analýzy pro přesnější charakterizaci těchto nádorů a lepší pochopení jejich biologických vlastností. Tato bakalářská práce se zaměřuje na molekulárně genetickou diagnostiku HGG u dětských pacientů v souladu s novými směry WHO klasifikace.

V teoretické části práce bude probrán přehled aktuálního stavu poznání v oblasti molekulární patologie HGG a jejich klasifikace podle nových směrů WHO. Zvláštní pozornost bude věnována genetickým abnormalitám spojeným s HGG, a to hlavně mutacím v genech *IDH1*, *IDH2*, *H3-3A*, *H3C2*, *BRAF*, *FGFR1* a *ACVRI*, které jsou pro nás klíčovými biomarkery pro diagnostiku a prognózu onemocnění.

V praktické části práce bude popsáno provedení molekulárně genetického vyšetření DNA u souboru dětských pacientů s HGG retrospektivně až do roku 2023. Tato analýza bude prováděna pomocí metodiky polymerázové řetězové reakce (PCR) a Sangerova sekvenování, které umožní identifikaci specifických patogenních variant vyšetřovaných genů. Výsledky molekulárního vyšetření budou následně analyzovány a korelovány s morfologickými a klinickými charakteristikami pacientů.

Cílem této práce je nejen poskytnout komplexní pohled na molekulární charakteristiku HGG u dětských pacientů, ale také zkoumat potenciální terapeutické cíle identifikované molekulárně genetickým vyšetřením ve spolupráci s dalšími odborníky jako jsou patologové, kliničtí onkologové a radiologové. V tomto kontextu je klíčovou hypotézou práce otázka, zda je možné na základě molekulárně genetické analýzy identifikovat vhodné terapeutické cíle pro léčbu pediatrických pacientů s HGG.



## 2 Teoretická část

### 2.1 *High-grade gliomy pediatrického typu: charakteristika a epidemiologie*

High-grade gliomy pediatrického typu jsou agresivní nádory mozku, které se vyskytují u dětí a mladistvých. Tyto nádory jsou charakterizovány svou vysokou malignitou a rychlým růstem, což značně ztěžuje jejich léčbu.

V případě HGG se jedná o vysoce infiltrující nádorové buňky daleko od makroskopicky zřetelné nádorové masy. Vzhledem k této skutečnosti je velice obtížné a často nemožné tyto nádory resekovat (Zámečník, 2019).

Z histologického hlediska se jedná o nádory s vysokou mírou buněčných atypií, vysokým podílem buněčné proliferace a velmi často i s nekrózou. HGG jsou obvykle klasifikovány jako WHO grade III (anaplastický astrocytom) nebo grade IV (v dospělé populaci glioblastom) a to v závislosti na jejich histologických a molekulárních charakteristikách.

Obecně u nádorů CNS mohou být zjištěny různé změny a molekulární abnormality, na základě kterých WHO v roce 2021 upravila jejich klasifikaci. Ta nyní zdůrazňuje primárně molekulární diagnostiku. U pediatrických HGG často nacházíme mutace v genech *H3-3A (H3F3A)*, *IDH1*, popř. *IDH2*, *BRAF*, *FGFR1* anebo *ACVR1*, které jsou stěžejní pro prognózu onemocnění a další terapeutické rozhodování. Právě vyšetření mutací v genu *BRAF*, *FGFR1* nebo *ACVR1* je důležité z potenciálně terapeutických důvodů – může totiž vést k indikaci cílené terapie i u prognosticky nepříznivého onemocnění, kterým pediatrické HGG jsou.

Všeobecnými klinickými příznaky, které jsou často způsobeny tlakem na mozkové struktury jsou například bolesti hlavy, neurologické deficity, epileptické záchvaty a další neurologické symptomy.

#### 2.1.1 *WHO klasifikace HGG pediatrického typu*

V roce 2021 vznikla již pátá WHO klasifikace, ve které se nově zavádí termín „pediatrický typ“, který odráží rozdílnou patobiologii, která je základem gliomů vznikajících primárně u dětí ve srovnání s dospělými. Difuzní high-grade gliomy u dětí jsou méně časté než častější low-grade gliomy a jejich různé typy jsou definovány v závislosti na typické lokalizaci, věku a molekulárních změnách. Zahrnují čtyři hlavní typy: 1) Difuzní středočárový gliom H3 K27-alterovaný; 2) Difuzní hemisférický gliom

H3 G34-alterovaný; 3) Difúzní gliom high-grade dětského typu H3-wildtype a *IDH* wildtype; a 4) Hemisférický gliom infantilního typu (Gianno et al., 2022).

### ***2.1.1.1 Difúzní středočárový gliom (H3 K27-alterovaný, DMG, DIPG)***

Difúzní gliom střední linie (DMG), H3 K27-alterovaný nebo také difúzní intrinsický pontinní gliom (DIPG) je středočárový infiltrativní gliom se ztrátou imunoexpresí trimetylace histonu H3 K28me3 (K27me3) a to obvykle substitucí *H3-3A c.83A>T/p.K28M (K27M)* v jedné z izoform histonu H3, aberantní nadměrnou expresí genu *EZH1/2*. Časté jsou rovněž mutace genu *EGFR*. Dle WHO gradingu je klasifikován jako grade 4 (WHO Classification of Tumours online).

#### Lokalizace:

Pediatrické DMG jsou primárně lokalizovány v oblasti mozkového kmene, pontu (DIPG) nebo jsou bithalamické, zatímco DMG u adolescentů či dospělých pacientů vznikají převážně jednostranně v thalamu nebo v míše, zatímco lokalizace v místech mimo střední linii, jako je epifýza nebo mozeček je výjimečná (Meyronet et al., 2017; Gilbert et al., 2018; Roux et al., 2020).

#### Klinické příznaky:

Většina pacientů s DIPG má velice krátkou anamnézu (kratší než dva měsíce) s klasickou triádou: obrna hlavových nervů (82 %), poškození pyramidálního traktu (51 %) a ataxie (62 %). (Hoffman et al., 2018). Mezi běžné počáteční příznaky thalamických DMG patří intrakraniální hypertenze a motorický nebo sensorický deficit (Steinbok et al., 2016).

#### Zobrazovací metody:

Na magnetické rezonanci mají DIPG klasicky epicentrum v pontu a typicky zahrnují více než 50 % jeho povrchu, často asymetricky a často s obalem bazilární tepny. (Steffen-Smith et al., 2014).

Může se objevit také exofytická (zevně rostoucí) složka a/nebo infiltrace do středního mozku, cerebrálních stopek a cerebrálních hemisfér. Thalamické nádory mohou být jak jednostranné, tak bilaterální, přičemž bilaterální je častější u podtypu s mutací genu *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) (Broniscer et al., 2018).

### Epidemiologie:

Epidemiologická data pro tyto nedávne popsaná vzácné onemocnění jsou prozatím nedostatečná. Incidence DIPG je odhadována na 0,54 případů na 1 milion osob za rok celkově a 2,32 případů na 1 milion osob za rok u pacientů ve věku pod 20 let a to bez predilekce pohlaví (Hoffman et al., 2018).

DIPG představuje 10–15 % všech dětských nádorů mozku a 75 % všech nádorů mozkového kmene u dětí. Thalamické DMG jsou vzácnější a představují pouze 1-5 % dětských nádorů mozku a 25 % nádorů thalamu (Ryall et al., 2016).

*EGFR*-mutované DMG se nejčastěji vyskytují v dětství a to s mediánem věku pacienta 7-8 let (Gessi et al., 2015; Chai et al., 2020).

V pediatrické populaci výskyt *H3-3A* p.K28M (K27M) - mutantních DMG a *H3-wildtype* DMG s nadměrnou expresí *EZH1P* vrcholí přibližně ve věku 7–8 let, zatímco *H3.1* (nově *H3C2*) nebo *H3.2* (nově *H3C15*) p.K28M (K27M)-mutované DMG se vyskytují u mladších pacientů s mediánem věku kolem 5 let (Castel et al., 2020; Hoffman et al., 2018; Mackay et al., 2017).

### Etiologie:

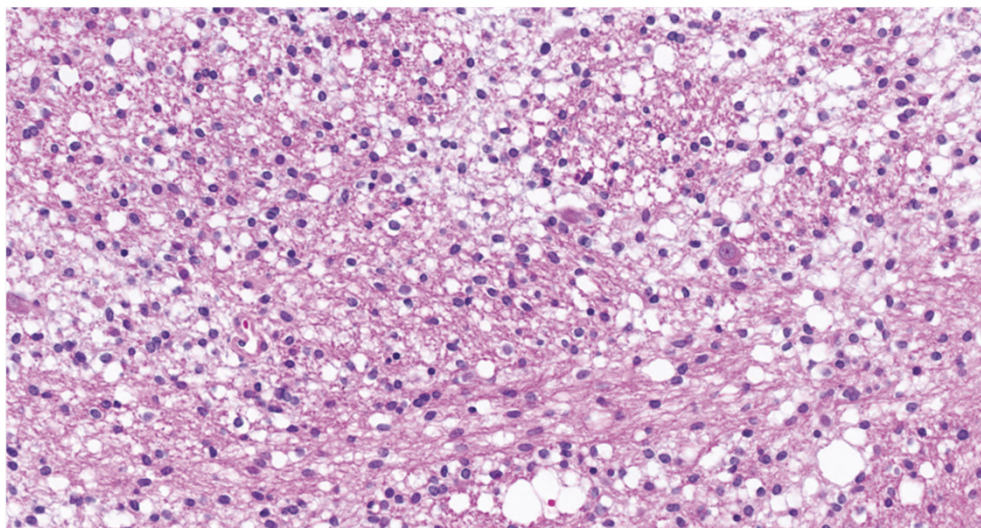
Prozatím není známa žádná specifická genetická náchylnost k DMG. Výjimečně se ale DMG mohou vyskytnout na pozadí k nádorům predisponujících syndromů, jako je například syndrom Li-Fraumeni nebo porucha opravných mechanismů ve struktuře DNA.

### Makroskopický vzhled:

Difúzní infiltrace parenchymu neoplastickými buňkami a s ní související edém způsobuje zvětšení a deformaci anatomických struktur, stejně tak jako měknutí a změnu barvy tkání s hemoragickými nebo nekrotickými zónami (Buczkwicz et al., 2014).

### Mikroskopický vzhled:

DMG difúzně infiltrují parenchym CNS, obvykle bez konkrétního perivaskulárního nebo perineuronálního tropismu. Většina buněk je malá a monomorfní, ale mohou být i polymorfní, vykazující astrocytární, piloidní, oligodendroglální, obrovskobuněčnou, nediferencovanou nebo epiteloidní cytologii (Solomon et al., 2016).



Obrázek 1 - mikroskopický obraz DIPG vykazující infiltrativní neoplastické buňky na edematózním pozadí s reziduálními neurony (Zdroj: Varlet, 2022).

U *EGFR*-mutovaných DMG je často přítomna mitotická aktivita, ale nekróza nebo mikrovaskulární proliferace jsou vzácné. DMG jsou považovány dle WHO za nádory CNS grade IV, bez ohledu na přítomnost mikrovaskulární proliferace nebo nekrózy.

#### Prognóza a predikce:

Nezávisle na lokalizace je prognóza DMG špatná a to s maximálně dvouletou mírou přežití pod 10 % (Mackay et al., 2017).

Chirurgické možnosti řešení jsou velice omezené vzhledem k lokalizaci nádoru.

Pacienti s DMG s mutací *H3C2* nebo *H3C15* p.K28M (K27M) nebo pacienti vykazující nadměrnou expresi *EZH1P* mají o něco delší celkové přežití (16 měsíců) než pacienti s DMG, kteří nesou *H3-3A* p.K28M (K27M) mutaci (11 měsíců) (Castel et al., 2018, 2020; Hoffman et al., 2018).

#### **2.1.1.2 Difúzní hemisférický gliom (H3 G34-alterovaný)**

Difúzní hemisférický gliom, H3 G34–alterovaný je infiltrativní gliom postihující mozkové hemisféry s missense mutací genu *H3-3A*, která vede k jedné z následujících substitucí histonového proteinu H3: c.103G>A/p.G35R (G34R), c.103G>C/p.G35R (G34R) nebo c.104G>T/p.G35V (G34V). Dle WHO gradingu rovněž je klasifikován jako grade IV (WHO Classification of Tumours online).

### Lokalizace:

Difúzní hemisférický gliom H3 G34-alterovaný vzniká v mozkových hemisférách. Občasně je pozorováno jeho rozšíření do středních struktur a také leptomeningeální diseminace (Korshunov et al., 2016; Mackay et al., 2017).

### Klinické příznaky:

Klinické příznaky se u pacientů manifestují dle příslušných anatomických struktur, včetně záchvatů a motorických a senzorických deficitů.

### Zobrazovací metody:

Charakteristiky magnetické rezonance jsou podobné jako u jiných nestředočárových HGG. Magnetická rezonance typicky odhaluje sytící se lézi podezřelou z high-grade gliomu v kortikálních oblastech, často zahrnující parietální nebo temporální lalok. Lze pozorovat také nekrózu, cystické změny, krvácení a kalcifikace (Vettermann et al., 2018).

### Epidemiologie:

Difúzní hemisférické gliomy typicky postihují dospívající a mladé dospělé ve věku 15-19 let. Některé studie ukázaly, že tyto nádory tvoří přibližně 16 % hemisférických HGG pediatrického typu (Kasper & Baker, 2020; Mackay et al., 2017).

### Etiologie:

Prozatím není známa žádná specifická genetická vnímavost pro H3 G34-alterované difúzní hemisférické gliomy a nebyly hlášeny žádné rizikové faktory.

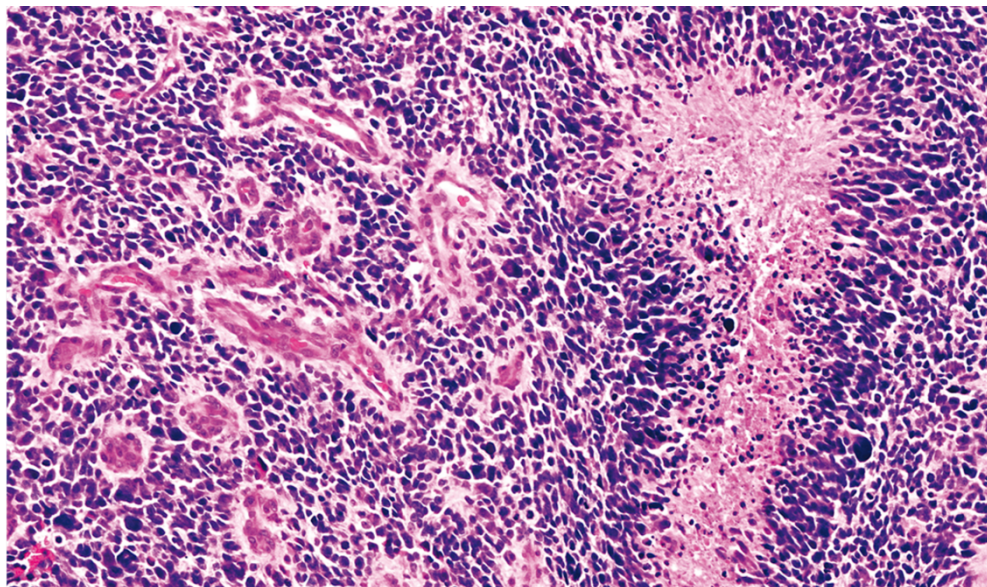
### Makroskopický vzhled:

Difúzní infiltrace parenchymu způsobuje zvětšení a deformaci mozkových struktur, stejně jako změkčení a změnu barvy s hemoragickými a/nebo nekrotickými zónami.

### Mikroskopický vzhled:

Difúzní hemisférický gliom má typicky glioblastomový vzor, charakterizovaný vysoce buněčným, infiltrativním astrocytárním tumorem s rychlou mitotickou aktivitou. Navíc je obvykle pozorována mikrovaskulární proliferace a/nebo nekróza, ačkoli přítomnost

těchto znaků není pro diagnózu nutná. V některých případech lze pozorovat mnohojaderné a pleomorfní buňky (Korshunov et al., 2016).



*Obrázek 2 - mikroskopický obraz difúzního hemisférického gliomu H3 G34-  
alterovaného ukazující palisádovitou nekrózu (Zdroj: Leske, 2022).*

#### Prognóza a predikce:

Prognóza pacientů s difúzním hemisférickým gliomem H3 G34 je špatná, s mediánem přežití bez progresu 9 měsíců a mediánem celkového přežití 18–22 měsíců (Korshunov et al., 2016; Mackay et al., 2017). U pacientů dochází převážně k lokálním recidivám, ale může dojít i k leptomeningeální diseminaci.

V případě metylace promotoru MGMT a absence amplifikace některých z protoonkogenů může být toto onemocnění spojeno s delším celkovým přežitím (Korshunov et al., 2016).

#### **2.1.1.3 Difúzní high-grade gliom dětského typu (H3-wildtype, IDH-wildtype, pHGG)**

Difúzní high-grade gliom dětského typu H3-wildtype a IDH-wildtype je difúzní gliom s maligními histologickými rysy, typicky se vyskytující u dětí, dospívajících nebo mladých dospělých. Taktéž dle WHO gradingu klasifikován jako grade IV.

#### Lokalizace:

Vznik pHGG bývá popisován primárně v supratentoriálním mozku, mozkovém kmeni a mozečku. Lokalizace bývají mírně odlišné, a to v závislosti na molekulárním subtypu pHGG (Korshunov et al., 2017).

### Klinické příznaky:

Podobně jako u jiných HGG se u pacientů rozvíjí klinické příznaky dle příslušných anatomických struktur. Také mohou zahrnovat záchvaty a motorické nebo senzorické deficity.

### Zobrazovací metody:

Magnetická rezonance může odhalit podobné charakteristiky, jako u ostatních HGG s to typicky nádor sytící se lézi podezřelou z high grade gliomu. Některé subtypy pHGG se mohou odlišovat například mírným ohraničením nebo pouze mírným edémem (Tauziède-Espariat et al., 2019).

### Epidemiologie:

Aktuální epidemiologická data pro pHGG dosud neexistují.

### Etiologie:

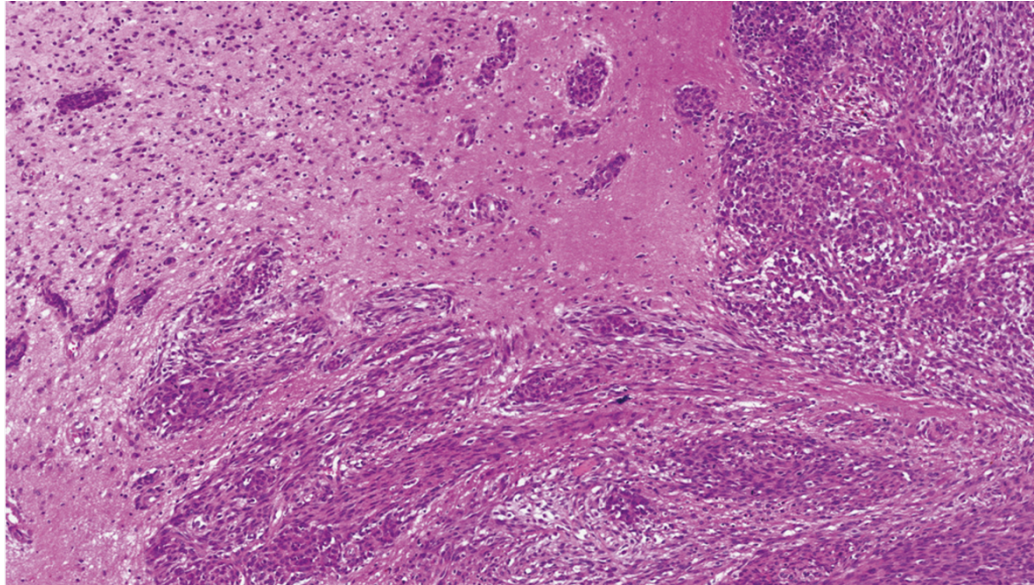
Typicky molekulární charakteristiky kompatibilní s pHGG mají gliomy vznikající po terapeutickém ozáření tzv. radioterapií indukované gliomy (RIG) nebo gliomy spojené s poruchou opravných mechanismů ve struktuře DNA (López et al., 2019).

### Makroskopický vzhled:

Makroskopický vzhled bývá typický pro HGG. Difuzní infiltrace parenchymu způsobuje zvětšení a deformaci mozkových struktur, stejně jako změkčení a změnu barvy s hemoragickými a/nebo nekrotickými zónami.

### Mikroskopický vzhled:

Histopatologie typicky vykazuje znaky buď maligního nádoru podobného glioblastomu (s mitotickou aktivitou, vaskulární proliferací a nekrózou) nebo primitivní, nediferencovanou morfologii. Ve stejném vzorku tkáně lze často nalézt obě oblasti – jak oblasti gliové diferenciace, tak oblasti primitivní diferenciace. V některých případech může chybět vaskulární proliferace a nekróza.



Obrázek 3 - mikroskopický obraz pHG G H3-wildtype a IDH-wildtype – nádor je vysoce buněčný, připomínající embryonální morfologii a vykazující ostré ohraničení od mozkové tkáně (Zdroj: Varlet, 2022).

#### Prognóza a predikce:

Údaje z jedné multiinstitucionální studie naznačují maximálně dvouletou míru přežití u 23,5 % nemocných a mediánem celkového přežití 17,2 měsíce. Studie také ukázala, že mediány celkového přežití jsou rozdílné v závislosti na subtypu pHG G. (Korshunov et al., 2017).

Prozatím existuje málo údajů o potenciálně terapeuticky cílitelných změnách (například mutace nebo amplifikace genů *PDGFRA* nebo *EGFR*), nicméně jejich prediktivní výpověď musí být ještě dostatečně prokázána.

#### **2.1.1.4 Hemisférický gliom infantilního typu**

Hemisférický gliom infantilního typu je cerebrální hemisférický high-grade astrocytom vznikající v raném dětství. Je typický svými molekulárními změnami, jako jsou například fúze genů pro receptory tyrozinkináz (*NTRK*, *ROSI*, *ALK* nebo *MET*.)

#### Lokalizace:

Místem vzniku těchto gliomů je supratentoriální kompartment, gliomy obvykle tvoří velké masy. Často zde dochází k povrchovému poškození (leptomeningeálnímu rozsevu) (Clarke et al., 2020).



### Klinické příznaky:

Prezentace klinických příznaků bývá obvykle akutní. Během kojeneckého věku u dětí s hemisférickým gliomem infantilního typu mohou projevovat nespecifické symptomy od agitovanosti až po letargii. Zároveň lze pozorovat makrocefalii (velký obvod hlavy).

Některé z těchto tumorů lze diagnostikovat ještě před porodem.

### Epidemiologie:

Všechny prozatím známe případy se vyskytly v raném dětství, většinou v prvním roce života. Dle uvedené studie byl medián věku projevu klinických příznaků 2.8 měsíce (v rozmezí 0-12 měsíců) (Guerreiro Stucklin et al., 2019).

### Etiologie:

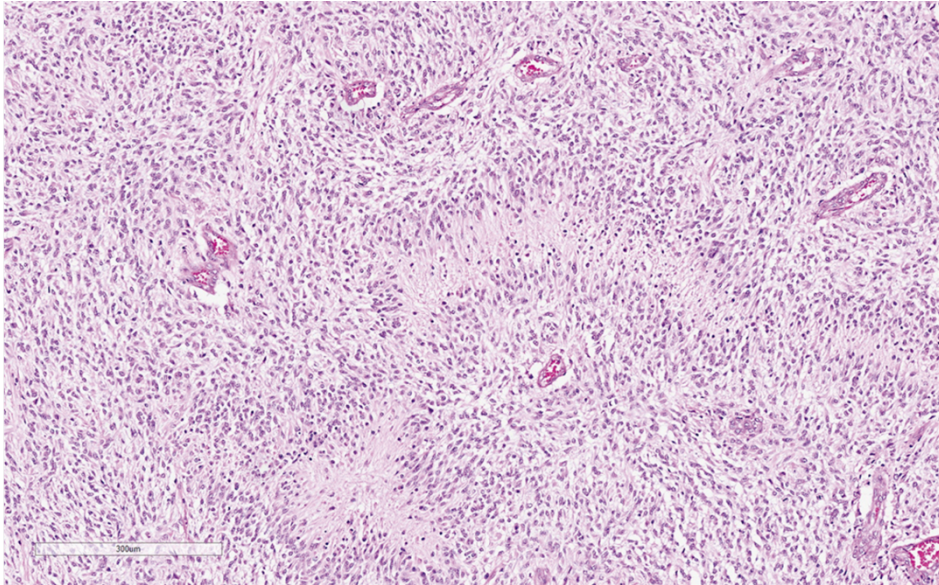
Prozatím není známa.

### Makroskopický vzhled:

Prozatím existuje velmi málo popsaných makroskopických změn. Uvádí se, že tyto gliomy jsou velké a obsahují cystickou složku a pevnou část. Zároveň zde může dojít k nekróze a krvácení (Aghajan et al., 2016; Clarke et al., 2020; Coccé et al., 2016; Guerreiro Stucklin et al., 2019; Ng et al., 2019; Olsen et al., 2015; Valera et al., 2020).

### Mikroskopický vzhled:

Nádory jsou mnohobuněčné, dobře ohraničené od přilehlého mozkového parenchymu (Clarke et al., 2020). Astrocytární, často vřetenité buňky s mírnou až střední pleomorfii jsou uspořádány ve svazcích nebo jednotných listech. Často zde dochází k palisádovité nekróze, mitotické aktivitě s mikrovaskulární proliferací.



*Obrázek 4 - mikroskopický obraz hemisférického gliomu infantilního typu vykazující klasické rysy HGG včetně palisádovitě nekrózy a proliferace endotelu (Zdroj: Hawkins, 2022).*

#### Prognóza a predikce:

Prozatím chybí relevantní výsledky pro posouzení prognózy a predikce tohoto onemocnění. Historicky bylo zjištěno, že HGG u kojenců mají lepší výsledky než u starších dětí (Duffner et al., 1999).

Celkový počet klinicky anotovaných případů je v rámci každého molekulárního podtypu relativně malý a k potvrzení některých počátečních pozorování je zapotřebí více prospektivních studií, ale vzhledem k přítomnosti fúzí genu pro receptor tyrozinkinázy se nabízí příležitost pro cílenou léčbu tyrozinkinázovými inhibitory.

### 3 Molekulární patologie high-grade gliomů pediatrického typu

Základními vyšetřovacími postupy, které se využívají v patomorfologické diagnostice nádorů stále zůstávají bioptická vyšetření, kde je možné kromě základního barvení využít i vysoce specializované metody, jako je histochemie, enzymová histochemie, imunohistochemie, elektronová mikroskopie a v neposlední řadě molekulární diagnostika (Staněk et al., 2023).

Molekulární diagnostika onkologických onemocnění využívá biomarkerů prokazujících kvantitu či genetický status molekul reagujících s podanými léčivy nebo hodnotí změny příslušné signální dráhy z hlediska prognózy onemocnění. V onkologii se tato diagnostika zabývá studiem dysregulace procesů souvisejících se vznikem i rozvojem onemocnění, a tak sleduje mutační změny, které mají vliv na transformaci nádoru. Z tohoto důvodu se molekulární diagnostika stala nedílnou součástí diagnostického vyšetření, klinické medicíny, onkochirurgické problematiky a onkologické terapie (Staněk et al., 2023).

V případě nádoru CNS se molekulární diagnostika stala již nedílnou součástí doplňující histologickou klasifikaci a je založena na stanovení genetických a epigenetických změn, případně na změnách genové exprese.

Za zmínku v molekulární diagnostice HGG pediatrického typu stojí vyšetření mutací genů *BRAF*, *FGFR1*, *ACVRI*, popř. *PDGFRA*.

Gen *BRAF* hraje klíčovou roli v proliferaci, diferenciaci, buněčné motilitě a apoptóze. Na základě těchto zjištění bylo použito *BRAF* jako terapeutického cíle milníkem. Nejčastější z cílitelných mutací genu *BRAF* je patogenní varianta p.V600E, která se vyskytuje zhruba u poloviny všech epiteloidních gliomů. Detekce mutace *BRAF* V600E představuje pozitivní prognostický ukazatel (Guarnaccia et al., 2022) z důvodu možné cílené terapie.

Receptor aktivinu A typu I (*ACVRI*) kóduje kostní morfogenetický receptor. Jeho funkce je spojena s mnoha biologickými procesy a v poslední době i s tumorigenezí. Somatické mutace v *ACVRI* byly spojovány s HGG dětského mozkového kmene, jejich specifická role však musí být ještě objasněna (Guarnaccia et al., 2022).

FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) je člen rodiny receptorů pro fibroblastový růstový faktor, který hraje klíčovou roli v regulaci buněčného růstu, diferenciaci

a migrace. U pediatrických pacientů s HGG může docházet k mutaci v genu pro *FGFR1*, což může ovlivnit jeho funkci a přispívat k vývoji nádoru. Cílené terapie zaměřené na inhibici *FGFR1* mohou být potenciálním terapeutickým cílem léčby pediatrických pacientů s HGG, kteří mají mutace v tomto genu. Studie a klinické zkoušky momentálně zkoumají účinnost různých léčiv cílených na *FGFR1* a jejich schopnost ovlivnit růst a šíření nádoru.

### **3.1 Molekulární patologie difúzního středočárového gliomu (H3 K27-alterovaného, DMG, DIPG)**

DMG je v rámci molekulární patologie charakterizován ztrátou imunoexpresí *H3K27me3* a je molekulárně definován do tří podtypů: 1) DMG s mutací *H3K27M/I*, zahrnující případy *H3.3*-mutant a *H3.1* nebo *H3.2*-mutant; 2) DMG, *H3*-wildtype s nadměrnou expresí *EZH2*; a 3) DMG, se změnou *EGFR*, včetně mutace např. *EGFRvIII* (Gianno et al., 2022).

#### **3.1.1 DMG s mutací H3K27M/I**

Difúzní středočárové gliomy gliomy (DMG) s mutací *H3 K27M*, velmi raritně *H3 K27I* představují specifickou skupinu nádorů mozku, které jsou charakterizovány přítomností mutace v genové sekvenci, která kóduje histon *H3*. Tato mutace je známá jako *H3K27M* a je spojena s diagnózou difúzních intrinzických pontinních gliomů (DIPG) a dalších DMG u pediatrických pacientů.

Mutace *H3K27M* se týká substituce aminokyseliny methioninu (M) za lysin (K) na pozici 27 v kódující sekvenci histonu *H3*, který je strukturálním prvkem chromatinu. Tato mutace se může vyskytovat v různých variantách histonu *H3*, včetně *H3-3A*, *H3C2* a *H3C15* (Yuen & Knoepfler, 2013).

- **DMG s mutací H3.3 (nově H3-3A) - K27M:** Tyto nádory mají mutaci *H3K27M* v genové sekvenci kódující histon *H3.3 (H3-3A)*, což je varianta histonu *H3*, která se podílí na dynamických procesech chromatinu, zejména během vývoje a diferenciací buněk (Rosenbaum et al., 2019).
- **DMG s mutací H3.1 (H3C2) nebo H3.2 (H3C15) - K27M:** U těchto nádorů je mutace *H3K27M* lokalizována v genové sekvenci kódující histon *H3C2* nebo

*H3C15*, což jsou další varianty histonu H3. Tyto varianty mají také důležitou roli v chromatinových procesech a regulaci genové exprese (Rosenbaum et al., 2019).

Všechny tyto varianty DMG s mutací H3K27M/I jsou spojeny s agresivním fenotypem, rychlou progresí a špatnou prognózou. Mutace H3K27M/I vedou k epigenetickým změnám v chromatinu, které ovlivňují regulaci genové exprese a buněčné chování, což přispívá k nekontrolované proliferaci nádorových buněk a invazi do okolních tkání.

Tyto poznatky o mutacích H3K27M/I mají významné klinické důsledky pro diagnostiku, prognostiku a léčbu pacientů s DMG, a poskytují cenné informace pro výzkum nových terapeutických strategií cílených na epigenetické regulátory (Yuen & Knoepfler, 2013).

### **3.1.2 DMG H3-wildtype s nadměrnou expresí EZHIP**

Difuzní středočárové gliomy (DMG) H3-wildtype s nadměrnou expresí EZHIP představují specifický subtyp nádorů mozku pediatrického typu, které jsou charakterizovány kombinací absence mutace v histonu H3 a nadměrnou expresí proteinu EZHIP (Enhancer of Zeste Homolog Inhibitory Protein), což je známý epigenetický regulátor, který inhibuje enzymy zvané histon methyltransferázy, což má vliv na epigenetickou regulaci chromatinu a genovou expresi (Pathania et al., 2017).

Nadměrná expresí EZHIP může narušovat epigenetickou regulaci chromatinu a genovou expresi, což může vést k nekontrolované proliferaci nádorových buněk a invazi do okolních tkání. Tato dysregulace epigenetiky může také ovlivnit odpověď na terapii a prognózu pacientů (Justin et al., 2016).

### **3.1.3 DMG se změnou EGFR (např. mutace EGFRvIII)**

Difuzní středočárové gliomy (DMG) s mutací *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) představují subtyp nádorů mozku, které jsou charakterizovány změnou v genetické sekvenci genu *EGFR* a/nebo jeho expresí. Jednou z důležitých mutací v tomto kontextu je mutace známá jako *EGFRvIII*, což je specifická varianta *EGFR* spojená s růstem nádorů a terapeutickou rezistencí. Tato změna je způsobena delecí 268 kodonů kódujících extracelulární doménu genu *EGFR*, a to konkrétně v exonech 2–7, což vede k produkci zkráceného proteinu. *EGFRvIII* varianta receptoru tedy postrádá extracelulární doménu a z tohoto důvodu nemá schopnost vázat ligand. Přesto však zůstává aktivní (Nikiforova and Hamilton, 2011).

Mutace *EGFR*, včetně *EGFRvIII*, mohou vést k aktivaci signálních drah, které podporují růst a přežití nádorových buněk. To může zahrnovat aktivaci dráhy PI3K/AKT/mTOR a MAPK, které jsou známé pro svou roli v buněčné proliferaci a metastázování (Heimberger et al., 2005).

### **3.2 Molekulární patologie difúzního hemisférického gliomu (H3 G34-alterovaného)**

Řídící změnou je bodová mutace v kodonu 35 histonu H3.3 genu *H3-3A*. To vede k substituci aminokyseliny glycinu na arginin (G34R) nebo méně často k valinu (G34V). Souběžné mutace *TP53* a *ATRX* jsou přítomny přibližně u 90 % případů; Často bývá přítomna metylace promotorové oblasti genu *MGMT*. Přibližně 50 % až 70 % difúzních hemisférických gliomů H3 G34-alterovaných má mutaci v genu *PDGFRA* (Gianno et al., 2022). Medián přežití pacientů s G34-alterovanými nádory je 22 měsíců. Přítomnost metylace promotoru *MGMT* (O6-methylguanine – DNA methyltransferase) souvisí s lepší prognózou z důvodu lepší odpovědi na léčbu alkylačními činidly (temozolomid, TMZ) (Nikiforova and Hamilton, 2011), zatímco přítomnost amplifikace určitých onkogenů (např. *EGFR*) je spojena s horší prognózou. Identifikace mutací *PDGFRA* ve více než 50 % případů může těmto pacientům nabídnout nové terapeutické možnosti (Gianno et al., 2022).

### **3.3 Molekulární patologie difúzního gliomu high-grade dětského typu (H3-wildtype, IDH-wildtype, pHGG)**

Difúzní gliomy high-grade IDH-wildtype a H3-wildtype představují subtyp nádorů mozku u pediatrických pacientů, které nevykazují mutace v genech IDH (isocitrate dehydrogenase) ani v genech kódujících histon H3.

Skupina pHGG je heterogenní skupina pediatrických gliomů, která v současnosti definovaná kombinací specifické morfologie a následujících molekulárních znaků:

1. nepřítomnost mutací *IDH1/2*
2. nepřítomnost změn histonu, např. H3.3/H3.1/H3.2 pK27M,
3. srovnání nádoru s jedním ze tří pHGG metylační skupiny pHGG RTK1, pHGG RTK2 nebo pHGG MYCN nebo alternativně identifikace genetických změn, které jsou považovány za charakteristické pro tyto skupiny, ovlivňující *PDGFRA*, *EGFR*, resp. *MYCN* (Gianno et al., 2022).

Dokumentace nepřítomnosti abnormalit v genech pro *IDH* a *H3*, v korelaci s klinicko-patologickým kontextem, není sama o sobě dostatečná pro stanovení diagnózy pHGG H3/IDH WT. Důležitou roli pro finální stanovení diagnózy zde hraje metylační profilování.

### **3.4 Molekulární patologie hemisférického gliomu infantilního typu**

Základní diagnostická kritéria pro hemisférický gliom kojeneckého typu jsou kombinací klinicko-patologických a molekulárních charakteristik. Základem diagnózy morfologická diagnóza, prezentace v raném dětství (obvykle před 5. rokem věku) a hemisférická lokalizace doplněná o molekulární vyšetření. Hemisférický gliom kojeneckého typu je typicky podmíněn vznikem fúzního genu zahrnující gen receptorové tyrozinkinázy (RTK), tj. *NTRK 1/2/3*, *ALK*, *ROS1* a *MET*. K diagnóze je také nutná přítomnost fúze nebo metylačního profilu hemisférického gliomu kojeneckého typu (Gianno et al., 2022).

Fúze s geny pro receptory tyrozinkinázy *NTRK1/2/3* jsou vzácné genetické změny pozorované v některých případech hemisférického gliomu infantilního typu. Tyto fúze mohou vést k aktivaci NTRK signální dráhy a podpořit buněčný růst a přežití nádorových buněk (Lezcano et al., 2018).

Stejně tak fúze s geny pro receptory tyrozinkináz *ALK*, *ROS1* nebo *MET*, které byly pozorované v některých případech hemisférického gliomu pediatrického typu mohou aktivovat specifické signální dráhy a přispět tak k růstu nádorových buněk a agresivitě nádoru (Bergethon et al., 2012; Drilon et al., 2017; Lin et al., 2017). Průkaz těchto fúzních genů má obrovský význam z důvodu možnosti cílené terapie pomocí inhibitorů tyrozinkináz (Larotrectinib, Entrectinib, Crizotinib, aj.).

## **4 Cíle práce a hypotézy**

### **4.1 Cíle práce**

1. Prvním cílem mé práce bylo vypracování odborné rešerše na téma molekulárně genetické diagnostiky high-grade gliomů pediatrického typu, a to dle nové WHO klasifikace z roku 2021, pro kterou je molekulárně genetická diagnostika stěžejní.
2. Druhým cílem má práce bylo vyšetřit soubor pediatrických pacientů s high-grade gliomy retrospektivně a stanovit molekulární profil HGG v korelaci s morfoloogickým nálezem a klinickým stavem včetně zobrazovacích metod.

### **4.2 Hypotézy**

1. V jaké míře jsme schopni pomocí molekulárně genetické analýzy DNA pediatrických HGG identifikovat vhodné terapeutické cíle ve spolupráci s patologi, klinickými onkology a radiology i přes nepříznivou prognózu tohoto onemocnění?



## 5 Praktická část

Praktickou část své bakalářské práce jsem provedla v Laboratoři molekulární patologie, která je součástí Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole pod vedením RNDr. Lenky Krskové, Ph.D.

### *5.1 Molekulárně genetické vyšetření high-grade gliomů pediatrického typu metodou PCR a Sangerova sekvenování*

#### *5.1.1 Odběr primárních vzorků*

Pro molekulárně genetické vyšetření se v případě high-grade gliomů využívá dvou typů vzorků, a to buď tkáň nativní zmražené anebo tkáň zalité v parafínu (FFPE).

Tyto vzorky jsou primárně zpracovány bioptickou laboratoří a následně morfologicky odečteny patologem, který v případě potřeby indikuje molekulárně genetické vyšetření.

V případě nativní zmražené tkáň je vzorek vložen do média, na kryostatu nakrájen na tenké řezy, které jsou vloženy do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek a před samotnou izolací DNA uloženy v mrazícím boxu při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Vzorky FFPE jsou na tenké řezy 5-10  $\mu\text{m}$  nakrájeny na mikrotomu a taktéž vloženy do 1,5 ml sterilních mikrozkušavek. Takto fixované řezy je možné před samotnou izolací DNA ponechat při laboratorní teplotě.

Ve skupině vyšetřované v rámci této bakalářské práce bylo izolováno a analyzováno celkem 42 vzorků pediatrických pacientů, z toho 31 vzorků nativní zmražené tkáň a 11 vzorků FFPE.

#### *5.1.2 Izolace DNA*

Pro molekulárně-genetické vyšetření využíváme vodný extrakt nukleové kyseliny (NK), který získáváme z nativní tkáň nebo tkáň FFPE pomocí metody izolace DNA.

Izolace DNA je metoda purifikace DNA pomocí fyzikálních a/nebo chemických metod ze vzorku, ve kterém dochází k oddělení DNA od buněčných membrán, proteinů a dalších buněčných složek. (Gupta, 2019).

Vlastní izolace DNA začíná lýzou buněk, která slouží k rozrušení buněčných membrán a tím i k uvolnění obsahu buňky. Dalším krokem je přidání proteolytických enzymů, ty

slouží k degradaci enzymů štěpících NK a buněčných proteinů, které tvoří komplex s DNA. Dalším krokem je vysrážení alkoholem, postupné promývání a následná eluce DNA (Penka & Slavičková, 2011).

Každý vzorek přijatý do Laboratoře molekulární patologie je před zpracováním zkontrolován v LIS (laboratorní informační systém) a následně zapsán do sešitu Příjem materiálu. Je nutné, aby se označení vzorku pro molekulárně-genetické vyšetření shodovalo s označením vzorku v LIS.

Je žádoucí také kontrolovat kvalitu izolátů DNA. V Laboratoři molekulární patologie se kvalita izolovaných NK kontroluje měřením koncentrace na spektrofotometru a následně také kontrolní multiplexovou PCR reakcí s kontrolním genem CTRL.

#### ***5.1.2.1 Izolace DNA z FFPE vzorků***

Přístroje použité k izolaci DNA z FFPE vzorků:

- Centrifugy
- Nastavitelné pipety (objem 0,5 – 1000 µl)
- Třepačka
- Termobloky

Reagencie použité k izolaci DNA:

- Xylen
- Absolutní (100 %) etanol
- Kit pro izolaci DNA z FFPE vzorků QIAamp®DNA FFPE tissue kit (QIAGEN)
  - Buffer ATL
  - Proteinase K
  - Buffer AL
  - Buffer AW1

- Buffer AW2
- Buffer ATE

Ostatní materiál použitý k izolaci DNA z FFPE vzorků:

- Sterilní pipetovací špičky
- 1,5 ml mikrokumavky
- Buničitá vata
- Jednorázové nitrilové rukavice

Pracovní postup izolace:

Nejprve jsem si na pracovní stůl připravila řádně označené vzorky v 1,5 ml mikrokumavkách a veškeré pomůcky a reagenty. Následně jsem zapnula tři termobloky a nastavila teplotu vyhřívání na 37 °C, 56 °C a 90 °C.

Do každé 1,5 ml mikrokumavky s parafinovýmí řezy jsem pipetou přidala 1 ml xylenu a přibližně 10 vteřin třepala na třepáče. Následně jsem vzorky přenesla do centrifugy, kde jsem je 2 minuty stáčela při 14 000 rpm a při laboratorní teplotě.

Po vyjmutí vzorků z centrifugy jsem z každé mikrokumavky opatrně slila supernatant tak, abych předešla ztrátě pelety a zbytek xylenu odsála mikropipetou. Poté jsem ke každému vzorku přidala 1 ml 100 % etanolu, každý vzorek protřepala v ruce, následně na třepáče a přenesla vzorky do centrifugy, kde jsem je opět 2 minuty stáčela při 14 000 rpm a laboratorní teplotě. Opět jsem opatrně slila supernatant, otevřela mikrokumavky a vložila vysušit do termobloku na 10 minut při 37°C.

Vyjmula jsem vzorky z termobloku a ke každému přidala 180 µl Buffer ATL, protřepala jsem je na třepáče tak, abych resuspendovala peletu a přidala 20 µl Proteinase K a znovu jsem vzorky řádně protřepala. Mikrokumavky jsem vložila do termobloku a inkubovala 1 hodinu při 56°C.

Následně jsem vzorky přendala do termobloku, kde jsem je inkubovala 1 hodinu při 90°C. Po uplynutí inkubační doby jsem vzorky centrifugovala 1 minutu při 8 000 rpm abych odstranila kapky z víčka mikrokumavky.

Ke každému vzorku jsem přidala 200  $\mu$ l Buffer AL a 200  $\mu$ l 100 % etanolu, řádně protřepala a krátce centrifugovala na minicentrifuze.

Do stojánku jsem si připravila izolační kolony se sběrnými zkumavkami a všechny řádně označila. Poté jsem celý obsah mikrozkuvek postupně přepipetovala do jednotlivých kolon a centrifugovala v centrifuze 1 minutu při 8 000 rpm.

Sběrné zkumavky (spodní část kolony) jsem vyhodila a kolony přendala do čistých sběrných zkumavek. Do kolony jsem přidala 500  $\mu$ l Buffer AW1 a zkumavky opět centrifugovala 1 minutu při 8 000 rpm.

Opět jsem vyhodila sběrné zkumavky a kolony vložila do čistých. Do každé kolony jsem přidala 500  $\mu$ l Buffer AW2 a zkumavky opět centrifugovala 1 minutu při 8 000 rpm.

Po centrifugaci jsem vyhodila sběrné zkumavky a kolony opět vložila do čistých zkumavek a stočila v centrifuze 3 minuty při 14 000 rpm tak, aby byla membrána kolon kompletně suchá. Během centrifugace jsem si připravila 1,5 ml mikrozkuvky, které jsem řádně označila.

Kolony jsem vložila do připravených mikrozkuvek, do každé jsem na střed membrány pipetou přidala 42  $\mu$ l Buffer ATE a nechala inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Mikrozkuvky jsem zavřela a vložila do centrifugy na 1 minutu při 14 000 rpm. Kolony jsem vyhodila a získané izoláty DNA v 1,5 ml mikrozkuvkách jsem dále použila pro měření koncentrace DNA.

Po změření koncentrace jsem izoláty vložila do chladničky, kde jsou skladovány maximálně 7 dní a poté jsou přesunuty do mrazícího boxu (-20 °C).

### ***5.1.2.2 Izolace DNA z nativní zmražené tkáně***

#### **Přístroje použité k izolaci DNA z nativní zmražené tkáně**

- Centrifugy
- Nastavitelné pipety (objem 0,5 – 1000  $\mu$ l)
- Třepačka

- Termobloky
- Laminární box

Reagencie použité k izolaci DNA z nativní zmražené tkáně:

- Absolutní (100 %) etanol
- 75 % etanol (-20 °C)
- Sterilní voda
- Chloroform
- Isopropanol (-20 °C)
- TRI Reagent® (Molecular Research Center)
- 0,1 M citrát sodný v 10 % etanolu

Ostatní materiál použitý k izolaci DNA z nativní zmražené tkáně:

- Sterilní pipetovací špičky
- 1,5 ml mikrozkušavky
- Buničitá vata
- Jednorázové nitrilové rukavice
- Chladicí stojánek na zkumavky

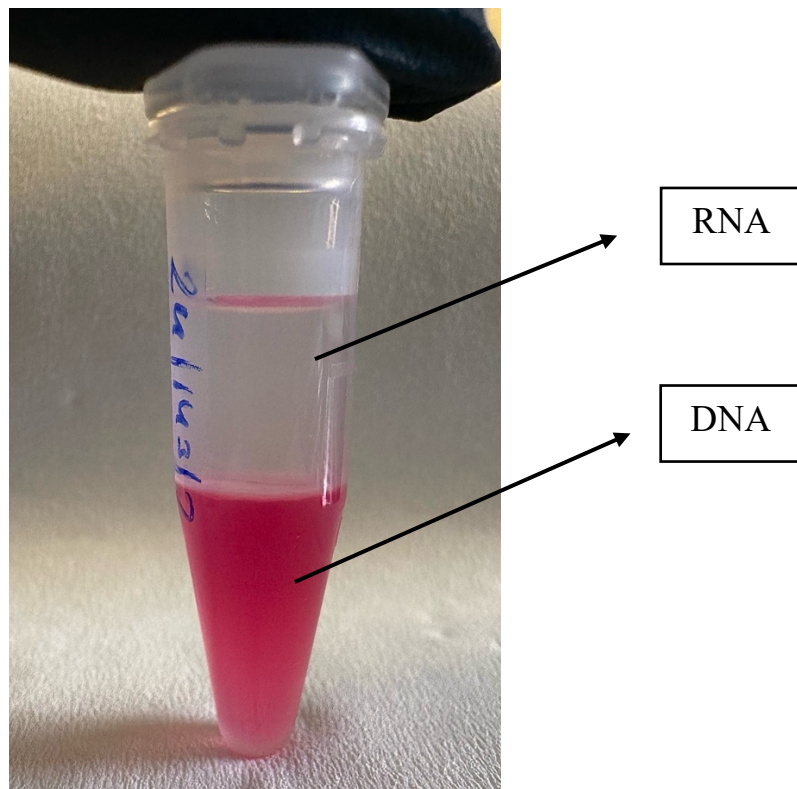
Pracovní postup izolace:

Nejprve jsem si do laminárního boxu připravila řádně označené vzorky v 1,5 ml mikrozkušavkách a veškeré pomůcky a reagencie, které jsou skladovány při laboratorní teplotě. Následně jsem zapnula dva termobloky, nastavila teplotu vyhřívání na 37 °C a 65°C a zapnula centrifugu s chlazením na 4°C.

Ke každému vzorku jsem pipetou přidala 1ml TRI Reagentu, velmi důkladně protřepala na třepače a inkubovala 5 minut při laboratorní teplotě.

Následně jsem ke každému vzorku přidala 200  $\mu$ l chloroformu a důkladně protřepala, dokud nevznikla mléčně růžová suspenze. Vzorky jsem následně inkubovala 3 minuty při laboratorní teplotě a poté centrifugovala v centrifuze 15 minut při 11 600 rpm a 4°C.

Během stáčení vzorků jsem si připravila 1,5 ml nové mikrozkušavky, které jsou řádně označila. Vzhledem k tomu, že tato metoda se využívá pro izolaci RNA i DNA najednou, po vyjmutí vzorků z centrifugy vznikly ve zkumavce dvě fáze (viz Obrázek č. 1), z nichž průhledná (nahore) obsahuje RNA a růžová (dole) obsahuje DNA. Standartně bych vrchní fázi odebrala do nových 1,5 ml mikrozkušavek a pokračovala pracovním postupem pro izolaci RNA, ale vzhledem k tomu, že mým cílem je pouze izolace DNA, mohu v následujícím kroku vrchní průhlednou fázi obsahující RNA odsát a vyhodit do infekčního odpadu a v izolaci DNA pokračovat pouze růžovou fází obsahující požadovanou DNA.



*Obrázek 5 - průhledná fáze (nahore) s obsahem RNA a růžová fáze (dole) s obsahem DNA. (Zdroj: vlastní)*

Po odsátí vrchní průhledné fáze jsem celý zbytek ve zkumavce odebrala, přepipetovala do nové a řádně popsané 1,5 ml mikrozkušavky a přidala 500  $\mu$ l 100 % etanolu. Převrácením jsem vzorky promíchala a nechala 3 minuty precipitovat při laboratorní teplotě. Následně jsem všechny vzorky vložila do centrifugy a centrifugovala 5 minut při 5 500 rpm a 4°C.

Vyjmula jsem všechny vzorky z centrifugy, přenesla zpět do laminárního boxu a z každé mikrozkušavky jsem opatrně do infekčního odpadu slila supernatant tak, abych neztratila peletu, která vznikla na dně. Ke každému vzorku jsem přidala 1 ml 0,1 M citrátu sodného, protřepala v ruce a poté vložila do třepačky a třepala na 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí času jsem vzorky vložila do centrifugy a centrifugovala 5 minut při 5 500 rpm a 4°C. Tento krok jsem celý zopakovala ještě jednou.

Okraje zkumavek jsem osušila na buničině a ke každému vzorku přidala 1 ml chlazeného 75 % etanolu z mrazničky a vložila třepat do třepačky na 15 minut při laboratorní teplotě. Následně jsem vzorky vložila do centrifugy a centrifugovala 5 minut při 5 500 rpm a 4°C.

Opět jsem slila supernatant, osušila okraje zkumavek na buničině a otevření zkumavky vložila vysušit do termobloku při 37°C.

Po vysušení jsem ke každému vzorku přidala 40  $\mu$ l sterilní vody a nechala pelety rozpustit v termobloku po dobu 30 minut a při teplotě 65°C. Po uplynutí této doby byly vzorky DNA připravené pro měření koncentrace DNA.

Po změření koncentrace jsem izoláty vložila do chladničky, kde jsou skladovány maximálně 7 dní a poté jsou přesunuty do mrazícího boxu (-20 °C).

### ***5.1.3 Měření koncentrace DNA***

#### Přístroje použité k měření koncentrace DNA:

- NanoDrop One spektrofotometr (ThermoFisher Scientific)
- Nastavitelná pipeta (objem 0,5 – 2  $\mu$ l)
- Třepačka

#### Reagencie použité k měření koncentrace DNA:

- Sterilní voda

### Ostatní materiál použitý k měření koncentrace DNA:

- Sterilní pipetovací špičky
- Buničitá vata
- Jednorázové nitrilové rukavice

### Pracovní postup měření koncentrace DNA na spektrofotometru NanoDrop One:

Jako první jsem spustila přístroj NanoDrop One a na pracovní stůl si připravila vyzolované DNA a sterilní vodu. Na přístroji jsem zvolila program měření dsDNA. Do spektrofotometru je nutné nejdříve napipetovat 1  $\mu$ l sterilní vody (blank), otřít spodní i horní plošku buničinou a teprve poté je přístroj připraven k samotnému měření koncentrace DNA.

Všechny izoláty jsem nejprve protřepala na třepačce. Na spodní plošku přístroje jsem napipetovala 1  $\mu$ l izolátu DNA a nechala přístroj změřit koncentraci. Následně jsem obě plošky opět otřela buničinou a pokračovala s dalším vzorkem. Takto jsem postupovala s každým vzorkem a jednotlivé koncentrace zaznamenala.

#### **5.1.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Vzhledem k tomu, že k provedení molekulárně-genetického vyšetření je nutné namnožit specifický úsek DNA, využíváme metody zvané polymerázová řetězová reakce (PCR).

PCR je metoda, která slouží ke zmnožení (amplifikaci) specifických úseků DNA využívající procesů denaturace, hybridizace a syntézy (replikace) DNA (Kočárek, 2007).

Proto, abychom mohli amplifikovat určité úseky DNA potřebujeme dva krátké úseky, které jsou komplementární k oběma jejím koncovým oblastem. Tyto úseky mají známou sekvenci a nazýváme je primery. Vzhledem k tomu, že primery jsou tvořeny velice malým počtem nukleotidů (20–25), označujeme je též jako oligonukleotidy. Důležitým pravidlem je, aby cílové sekvence DNA, se kterými primery hybridizují, byly specifické jen pro amplifikovanou oblast a nenacházely se v jiných místech DNA (Kočárek, 2007).

Samotná reakce je tvořena třemi dílčími kroky, které se cyklicky opakují. Prvním krokem je denaturace dsDNA, při které dochází k rozpletení dsDNA sloužící jako templát pro

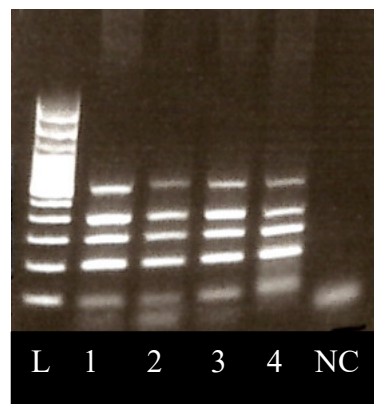


nově amplifikovanou DNA. V druhém kroku probíhá je nasedání primerů a posledním krokem je elongace, při které probíhá syntéza nových řetězců DNA (Penka a Slavíčková, 2011).

#### **5.1.4.1 Kontrola kvality DNA pomocí PCR reakce (amplifikace kontrolních genů CTRL)**

Amplifikace kontrolních genů CTRL je v Laboratoři molekulární patologie používána k ověření kvality a integrity izolované DNA. V tomto případě využíváme multiplexovou amplifikaci několika kontrolních genů CTRL. Pro tuto kontrolní amplifikaci bylo navrženo pět dvojic primerů, které amplifikují pomocí metody PCR produkty o velikosti 100, 200, 300, 400 a 600 bp. (Van Dongen et al., 2003). Výsledné PCR produkty vypovídají o kvalitě vyizolované DNA, popř. o její degradaci v průběhu procesu přípravy FFPE bloku.

K vizualizaci a následnému vyhodnocení se využívá agarózové elektroforézy.



*Obrázek 6 - vizualizace amplifikace genů CTRL (1–3; 4 – pozitivní kontrola) pomocí agarózové elektroforézy; L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola (Zdroj: vlastní)*

#### Přístroje použité ke kontrolní PCR reakci:

- Nastavitelné pipety (objem 0,5 – 1000 µl)
- Třepačka
- Minicentrifuga
- Laminární box
- Termocykler

#### Reagencie použité ke kontrolní PCR reakci:

- Sterilní voda
- Mix primerů CTRL (viz Příloha 1)
- Pozitivní kontrola (izolát DNA z buffy coatu)
- 10x PCR Blue Buffer Complete (Top-Bio)
- Taq-Purple Polymerase (Top-Bio)
- 2 mM dNTP (ThermoFisher Scientific)

#### Ostatní materiál použitý ke kontrolní PCR reakci:

- Sterilní pipetovací špičky
- 0,5 ml mikrozkušavky
- 0,2 ml mikrozkušavky
- Jednorázové nitrilové rukavice

#### Pracovní postup kontrolní PCR reakce:

Před přípravou samotné PCR reakce, která probíhala v laminárním boxu jsem si z mrazničky vyndala potřebné reagenty a nechala je vytemperovat na laboratorní teplotu. Poté jsem všechny reagenty protřepala na třepačce, centrifugovala v minicentrifuze a řádně si popsal všechny sterilní zkumavky, které jsem používala při přípravě reakce.

Nejprve jsem si připravila master mixy dle tabulky 1 a následně jsem do každé označené 0,2 ml mikrozkušavky (včetně zkumavky pro negativní kontrolu) rozpipetovala 49  $\mu$ l připraveného master mixu. Poté jsem do každé zkumavky (mimo negativní kontrolu) přidala 1  $\mu$ l DNA, do zkumavky s pozitivní kontrolou 1  $\mu$ l vyizolované DNA z lymfocytů zdravých dárců a do zkumavky s negativní kontrolou 1  $\mu$ l sterilní vody. Všechny zkumavky jsem protřepala na třepačce, krátce stočila a vložila do termocykleru. Průběh PCR reakce pro amplifikaci kontrolního genu CTRL je uveden v tabulce 2.

*Tabulka 1 - Složení master mixu pro amplifikaci genů CTRL a jednu reakci.*

<b>Reagencie</b>	<b>Množství na 1 reakci (<math>\mu</math>l)</b>
Sterilní voda	26
10x PCR Blue buffer complete	8
2mM dNTP	5
Taq-Purple polymerase	1
Primery – CTRL	8

*Zdroj: vlastní*

*Tabulka 2 - Reakční profil pro amplifikaci kontrolních genů CTRL v termocykleru.*

<b>Program termocykleru</b>	<b>°C</b>	<b>Minuty</b>
Denaturace	95 °C	2:00
Amplifikace	94 °C	0:45
	60 °C	0:45
	72 °C	1:30
Syntéza	72 °C	10:00
Chlazení	15 °C	$\infty$
Počet cyklů	35	

*Zdroj: vlastní*

#### **5.1.4.2 Vyšetření mutačního stavu genů *IDH1*, *IDH2*, *H3-3A*, *H3C2*, *ACVR1*, *FGFR1* a *BRAF* pomocí PCR reakce**

##### Přístroje použité k polymerázové řetězové reakci:

- Nastavitelné pipety (objem 0,5 – 1 000  $\mu$ l)
- Třepačka
- Minicentrifuga
- Laminární box
- Termocykler

##### Reagencie použité k polymerázové řetězové reakci:

- Sterilní voda
- Primery (viz Příloha 2)
- PCRBIO HS Taq Mix Red (PCR Biosystems)

##### Ostatní materiál použitý k polymerázové řetězové reakci:

- Sterilní pipetovací špičky
- 0,5 ml mikrozkušavky
- 0,2 ml mikrozkušavky
- Buničina
- Jednorázové nitrilové rukavice

##### Pracovní postup přípravy polymerázové řetězové reakce:

Před přípravou samotné PCR reakce, která probíhala v laminárním boxu jsem si z mrazničky vyndala potřebné reagencie a nechala je vytemperovat na laboratorní teplotu. Poté jsem všechny reagencie protřepala na třepačce, centrifugovala v minicentrifuze a řádně si popsala všechny sterilní zkumavky, které jsem používala při přípravě reakce.

Nejprve jsem si připravila master mixy dle tabulky 3, která je shodná pro všechny reakce a následně jsem do každé označené 0,2 ml mikrozkušavky (včetně zkumavky pro negativní kontrolu) napipetovala 24  $\mu$ l připraveného master mixu. Poté jsem do každé zkumavky (mimo negativní kontrolu) přidala 1  $\mu$ l vyšetřované DNA a do zkumavky s negativní kontrolou 1  $\mu$ l sterilní vody. Všechny zkumavky jsem protřepala na třepačce, krátce centrifugovala a vložila do termocykleru. Průběh PCR reakce pro amplifikaci požadovaných genů je uveden v tabulce 4.

*Tabulka 3 - Složení master mixu společné pro vyšetření mutací požadovaných genů.*

<b>Reagencie</b>	<b>Množství na 1 reakci (<math>\mu</math>l)</b>
Voda	9,5
PCRBIO HS Taq Mix Red	12,5
Primer – F	1
Primer – R	1

*Zdroj: vlastní*

*Tabulka 4 - Reakční profil pro amplifikaci vyšetřovaných genů v termocykleru.*

<b>Program termocykleru</b>	<b><math>^{\circ}</math>C</b>	<b>Minuty</b>
Denaturace	95 $^{\circ}$ C	2:00
Amplifikace	95 $^{\circ}$ C	0:15
	60 $^{\circ}$ C	0:15
	72 $^{\circ}$ C	1:00
Syntéza	72 $^{\circ}$ C	10:00
Chlazení	4 $^{\circ}$ C	$\infty$
Počet cyklů	40	

*Zdroj: vlastní*

### ***5.1.5 Detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy***

Po PCR reakci je nutné amplifikované produkty vizualizovat. Pro tento účel se nejčastěji používá gelová elektroforéza. Tato metoda dokáže rozdělit fragmenty dle jejich velikosti. Tyto fragmenty jsou následně porovnány s velikostním markerem (ladder, žebříček), který je na gel nanesen společně s produkty PCR (Alberts, 1998).

#### Přístroje použité k detekci PCR produktů:

- Nastavitelné pipety (objem 0,5 – 1 000  $\mu$ l)
- Elektroforetická vana
- Zdroj elektrického napětí
- UV transluminátor
- Mikrovlnná trouba

#### Reagencie použité k detekci PCR produktů:

- TBE pufr pro elektroforézu
- Agarózové tablety (Serva)
- GelRed Nucleid Acid Stain (EMD Milipore)
- 100bo DNA Ladder (ThermoFisher Scientific)

#### Ostatní materiál použitý k detekci PCR produktů

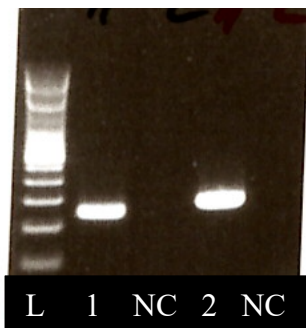
- Sterilní pipetovací špičky
- Termální papír s vysokým kontrastem
- Buničitá vata
- Jednorázové nitrilové rukavice

Pracovní postup přípravy polymerázové řetězové reakce:

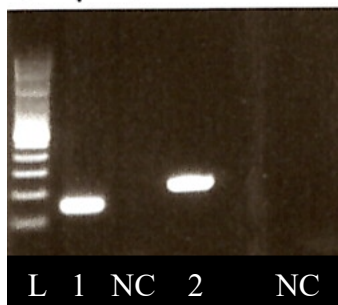
Nejprve jsem si připravila 1,5 % agarózový gel. Do kádinky jsem odlila 100 ml TBE pufru, ke kterému jsem vložila 3 agarózové tablety (každá o hmotnosti 0,5g) a nechala 5 minut rozpouštět při laboratorní teplotě. Následně jsem kádinku vložila do mikrovlnné trouby, kde se cca po 3 minutách tablety rozpustily. Poté jsem přidala 7  $\mu$ l GelRed Nucleic Acid Stain a promíchala a přelila do připravené vaničky s hřebenem. Gel jsem nechala přibližně 30 minut zatuhnout a poté byl připraven k použití.

Do elektroforetické vany jsem nalila TBE pufr a vložila připravený gel. Do každé jamky jsem napipetovala 8  $\mu$ l PCR produktu a do poslední jamky 1  $\mu$ l velikostního standardu (100bp DNA Ladder), Vanu jsem přikryla víkem, připojila ke zdroji napětí a nastavila požadovanou hodnotu (130 V). Zdroj jsem zapnula a nechala elektroforézu probíhat přibližně 30 minut.

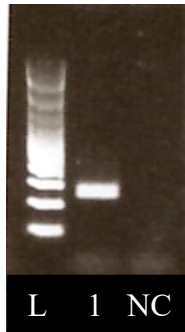
Následně jsem gel vyjmula z vany a přenesla do UV transluminátoru, který je připojen k PC. V softwaru jsem zvolila takové nastavení, aby byly produkty na gelu dobře viditelné a vytiskla na termopapír.



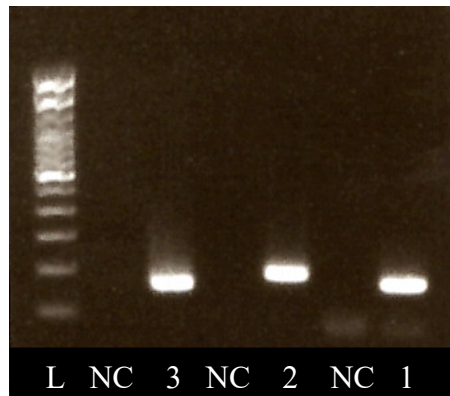
Obrázek 7 - Vizualizace PCR produktů genů IDH1 (1) a IDH2 (2); L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola. (Zdroj: vlastní)



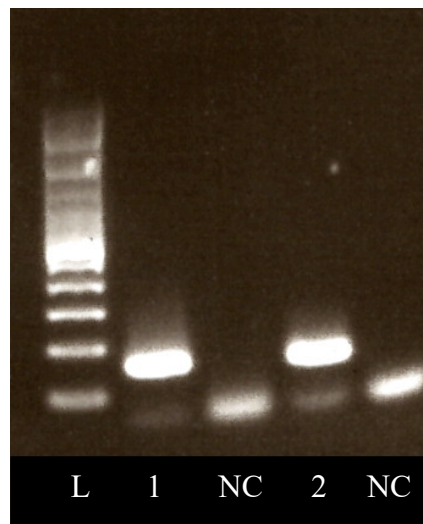
Obrázek 8 - Vizualizace PCR produktů genů H3-3A (1) a H3C2 (2); L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola. (Zdroj: vlastní)



Obrázek 9 - Vizualizace PCR produktu genu *BRAF* (1); L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola. (Zdroj: vlastní)



Obrázek 10 - Vizualizace PCR produktů genů *ACVR1* – 1 - exon 6; 2 - exon 7; 3 - exon 8; L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola. (Zdroj: vlastní)



Obrázek 11 - Vizualizace PCR produktů genů *FGFR1* – 1 - exon 12; 2 - exon 14; L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola. (Zdroj: vlastní)



### 5.1.6 *Přečištění PCR produktů*

Pro správnou identifikaci a analýzu vyšetřovaných mutací bylo následně nutné provést sekvenační analýzu pomocí Sangerova sekvenování. Před samotnou přípravou sekvenační reakce je potřeba PCR produkty přečistit od produktů použitých v PCR reakci.

#### Přístroje použité k přečištění PCR produktů:

- Nastavitelné pipety (objem 0,5 – 1 000 µl)
- Centrifuga

#### Reagencie použité k přečištění PCR produktů:

- Kit Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid)
  - DF buffer
  - WASH buffer
  - ELUTION buffer

#### Ostatní materiál použitý k přečištění PCR produktů

- Sterilní pipetovací špičky
- 1,5 ml mikrozkušavky
- Kolony s filtrem z kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid)
- Buničitá vata
- Jednorázové nitrilové rukavice

#### Pracovní postup přečištění PCR produktů:

Nejprve jsem si do stojánku připravila všechny PCR produkty k přečištění a reagencie z kitu, včetně kolon s filtrem.

Ke každému PCR produktu jsem přidala 100 µl DF pufru a přepipetovala mix do připravených kolon. Následně jsem kolony stáčela 1 minutu při 14 000 rpm a při laboratorní teplotě.

Ze spodní části kolony jsem slila stočený objem a na střed každé přidala 600  $\mu$ l WASH pufru. Takto jsem kolony nechala stát 1 minutu při laboratorní teplotě a následně opět centrifugovala 1 minutu při 14 000 rpm a při laboratorní teplotě. Opět jsem ze spodní části slila stočený objem a stáčela 3 minuty při 14 000 rpm a při laboratorní teplotě.

Během centrifugace jsem si pro každý produkt připravila řádně popsanou 1,5 ml mikrozkušavku, do které jsem následně vložila vrchní část kolony s filtrem. Na střed každé kolony jsem přidala 50  $\mu$ l ELUTION pufru a nechala 2 minuty stát při laboratorní teplotě. Poté jsem zkumavky centrifugovala 2 minuty při 14 000 rpm a při laboratorní teplotě.

Vyhodila jsem vrchní část kolony, zavřela zkumavky a takto připravené vzorky k následné přípravě sekvenační reakce vložila do chladničky.

### **5.1.7 Sekvenační reakce**

Za účelem možné přesné identifikace a analýzy vyšetřovaných mutací využívá molekulárně genetická diagnostika metody Sangerova sekvenování. Tato technika je užitečná především při detekci jednotlivých změn v genech, jako jsou bodové mutace, inzerní/deleční mutace nebo jiné genetické varianty.

Při metodě Sangerova sekvenování nasedá amplifikovaná DNA na oligonukleotidový primer a poté je prodloužena enzymem DNA-polymerázou, která obsahuje směs čtyř fluorescenčně značených dideoxynukleotidtrifosfátů ukončujících řetězec (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Tyto ddNTP svojí vazbou tak zastavují elongační reakci, což vede k odlišení fragmentů DNA o různých délkách (Crossley et al., 2020).

#### Přístroje použité k přípravě sekvenace:

- Nastavitelné pipety (objem 0,5 – 1 000  $\mu$ l)
- Laminární box
- Třepačka
- Minientrifuga
- Centrifuga

- Termocykler
- Sekvenátor 3500Dx (Applied Biosystems)

Reagencie použité k přípravě sekvenace:

- BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix – BDT (ThermoFisher Scientific)
- Sterilní voda
- Primery (viz Příloha č. 1)
- Hi-Di™ Formamide (ThermoFisher Scientific)

Ostatní materiál použitý k přípravě sekvenace:

- Sterilní pipetovací špičky
- 1,5 ml mikrozkušavky bez víček
- 0,5 ml mikrozkušavky
- 0,2 ml mikrozkušavky
- Kolony NucleoSEQ (Macherey-Nagel)
- MicroAmpOptical 96-Well Reaction Plate
- Plastový stojánek na 96-Well
- Septum na 96-Well
- Jednorázové nitrilové rukavice

Pracovní postup k přípravě sekvenace:

Před přípravou samotné sekvenační reakce jsem si z mrazničky vyndala zkumavku s BDT a všechny primery a nechala vše vytemperovat na laboratorní teplotu. Před otevřením jsem všechny reagencie protřepala na třepačce.

Nejprve jsem si řádně popsala všechny zkumavky a poté připravila master mix dle tabulky 5. Do každé zkumavky jsem napipetovala 6 µl master mixu a 1 µl příslušného primeru.

Následně jsem do zkumavek napipetovala 1  $\mu$ l příslušného přečištěného PCR produktu, zkumavky protřepala na třepačce, krátce centrifugovala v minicentrifuze a vložila do termocyklieru, kde jsem spustila program pro sekvenační reakci. Průběh programu pro sekvenační reakci je uveden v tabulce 6.

*Tabulka 5 - Složení master mixu pro přípravu sekvenační reakce*

<b>Reagencie</b>	<b>Množství na 1 reakci (<math>\mu</math>l)</b>
Sterilní voda	5,5
BDT v3.1	0,5
Primer	1
PCR produkt	1

*Zdroj: vlastní*

*Tabulka 6 - Reakční profil sekvenační reakce společný pro vyšetření všech mutací (termocyklier).*

<b>°C</b>	<b>Minuty</b>
96 °C	0:10
50 °C	0:05
60 °C	0:04
4 °C	$\infty$
počet cyklů - 30	

*Zdroj: vlastní*

Abychom optimalizovali podmínky pro sekvenování, je nutné produkty sekvenační reakci přečistit. Tímto přečištěním odstraníme zbytky reakčních komponent (polymeráza, nukleotidy či zbytky fluorescenčních barviv) a také dalších vedlejších produktů, které mohou během sekvenační reakce vznikat (nerozpojené fragmenty DNA, chybně prodloužené fragmenty DNA apod.).

### Pracovní postup přečistění sekvenační reakce:

Nejprve jsem si připravila příslušný počet kolon a řádně jsem je označila. Poté jsem vložila kolony centrifugovat do centrifugy na 30 sekund při 3000 rpm. Po stočení jsem do každé kolony přidala 600  $\mu$ l sterilní vody, protřepala na třepačce a nechala stát 30 minut při laboratorní teplotě.

Ze spodní části hydratovaných kolon jsem odstranila „klobouček“, vložila je do centrifugy a centrifugovala 2 minuty při 3000 rpm. V tomto čase jsem si do stojánku připravila příslušný počet 1,5 ml mikrozkušavek bez víček. Spodní část kolon jsem vyhodila a vrchní část vložila do připravených 1,5 ml mikrozkušavek.

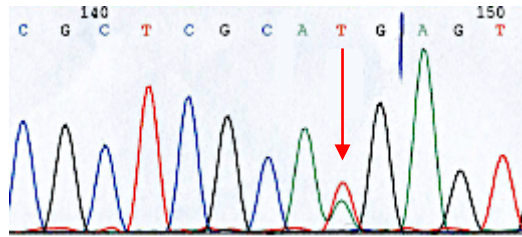
Ke každému vzorku sekvenační reakce jsem přidala 15  $\mu$ l sterilní vody, řádně špičkou promíchala a celý obsah jsem opatrně přenesla na střed gelu v koloně. Poté jsem zkumavky vložila do centrifugy a centrifugovala 6 minut při 3000 rpm.

Po stočení všech vzorků jsem si připravila MicroAmpOptical 96-Well Reaction Plate (destička), odstranila vrchní část kolony a z 1,5 ml mikrozkušavek jsem do příslušných pozic přepipetovala všechny vzorky. Pokud jsem nezaplnila celý sloupec, do prázdných pozic jsem napipetovala 25  $\mu$ l Hi-Di™ formamidu tak, aby se v sekvenátoru zaplnily všechny kapiláry.

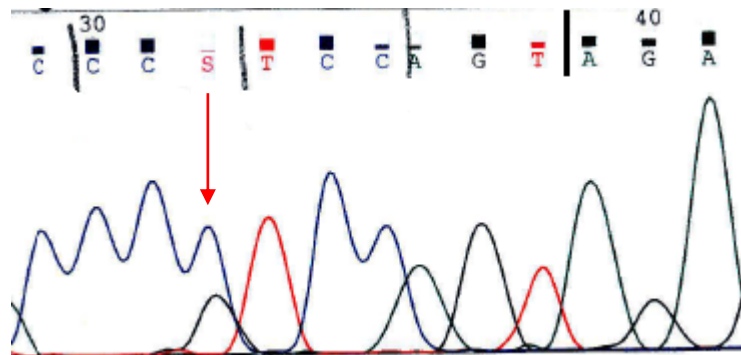
Destičku jsem přikryla septem, vložila do plastového stojánku a finálně do sekvenátoru.

Do softwaru u sekvenátoru jsem vypsala vzorky do příslušných pozic, uložila experiment pod příslušným názvem, zkontrolovala dostatek všech reagentů v přístroji a následně spustila.

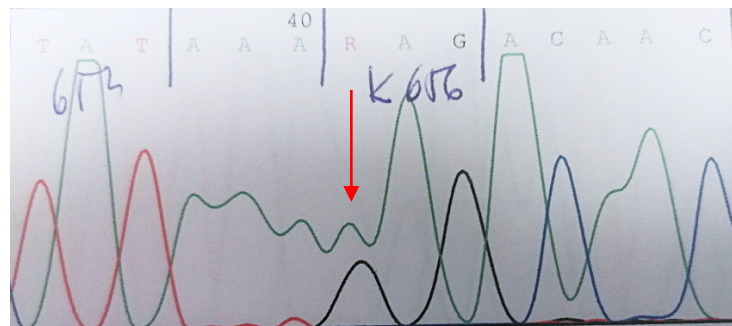
Výsledkem sekvenační analýzy je tzv. sekvenční elektroforetogram, což je grafické zobrazení, které ukazuje intenzitu signálu v závislosti na pozici v sekvenci DNA. Na ose x jsou zobrazeny jednotlivé nukleotidy v pořadí, zatímco na ose y je intenzita signálu. Tento elektroferogram poskytuje detailní informace o pořadí nukleotidů v sekvenci DNA a je základem pro interpretaci výsledků.



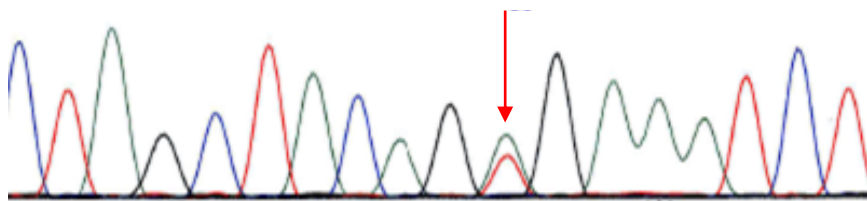
Obrázek 12 - Sekvenční elektroforetogram genu H3-3A – šipka ukazuje místo mutace H3-3A(NM\_002107.7):c.83A>T p.(Lys28Met)/K27M. (Zdroj: vlastní)



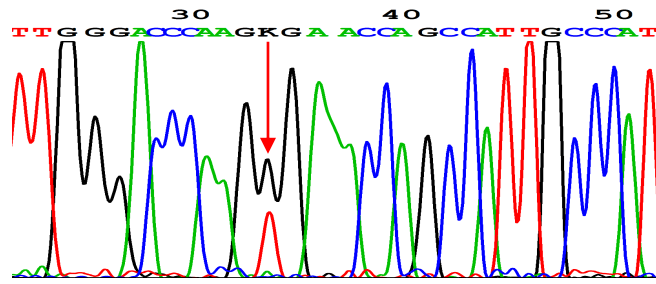
Obrázek 13 - Sekvenční elektroforetogram genu H3-3A – šipka ukazuje místo mutace H3-3A(NM\_002107.7):c.103G>C p.(Gly35Arg)/G34R. (Zdroj: vlastní)



Obrázek 14 - Sekvenční elektroforetogram genu FGFR1 – šipka ukazuje místo mutace FGFR1(NM\_023110.3):c.1966A>G p.(Lys656Glu)/K656E. (Zdroj: vlastní)



Obrázek 15 - Sekvenční elektroforetogram mutace genu BRAF – šipka ukazuje místo mutace BRAF(ENST00000646891.2):c.1799T>A p.(Val600Glu)/V600E. (Zdroj: vlastní)



Obrázek 16 - Sekvenční elektroforetogram mutace genu *ACVR1* – šipka ukazuje místo mutace *ACVR1*(*NM\_001111067.4*):*c.983G>Tp.(Gly328Val)*. (Zdroj: vlastní)

## 6 Výsledky

Pro molekulárně genetické vyšetření skupiny pediatrických pacientů v této bakalářské práci bylo vybráno a retrospektivně vyšetřeno celkem 42 pediatrických pacientů ve věku 0,75 až 19 let s diagnózou HGG. Přehledná tabulka celé skupiny pacientů, včetně jejich věku, ve kterém byli diagnostikováni, diagnózami a vyšetřovanými mutacemi je součástí této bakalářské práce jako Příloha 2.

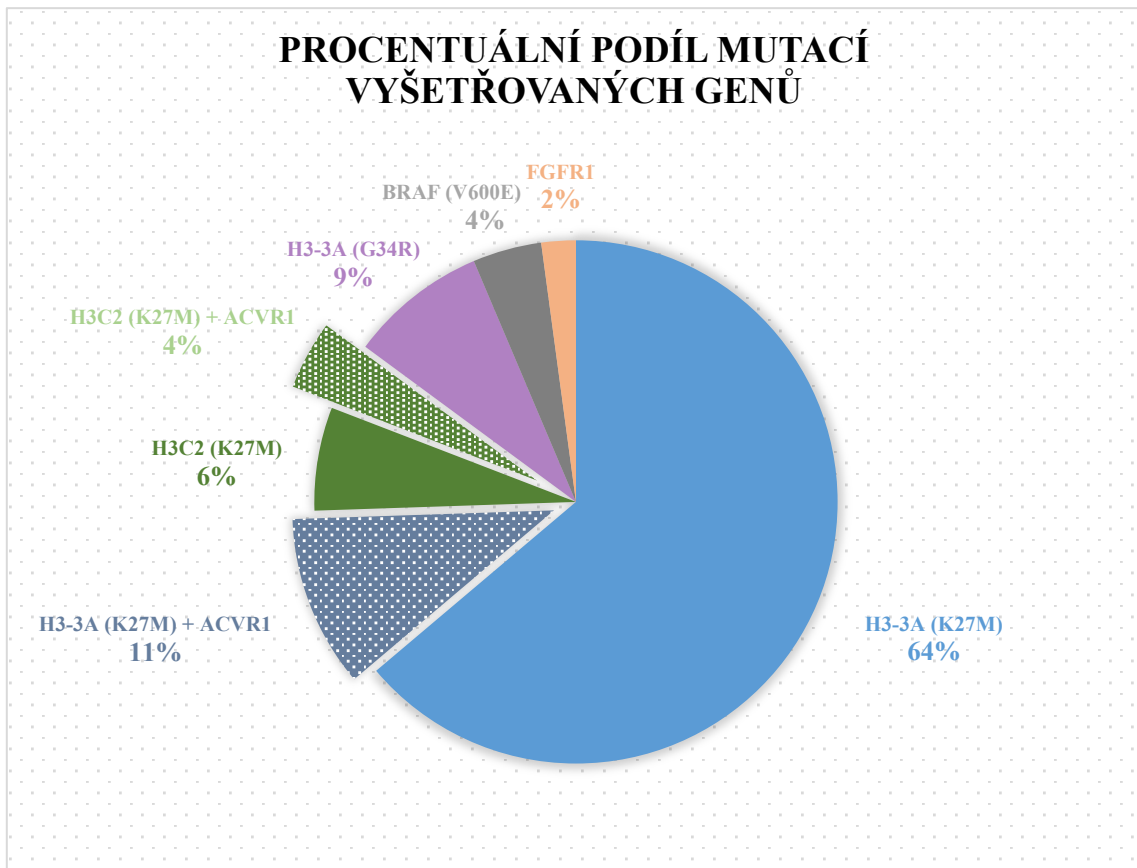
Ve 100 % případů vyšetření diagnostického cíle v genech *IDH1* a *IDH2* byla nalezena nemutovaná forma tohoto genu (wt), což je odpovídající pro diagnózu HGG pediatrického typu.

Další vyšetřovanou diagnostickou změnou byly mutace v genech *H3-3A* a *H3C2*. Mutace K27M genu *H3-3A*, která je nejčastější mutací diagnózy DIPG/DMG byla nalezena u 30 pacientů (64 %) a z toho u 5 (11 %) pacientů v kombinaci s potenciálně terapeuticky cílitelnou mutací v genu *ACVR1*. Méně častá mutace K27M genu *H3C2* byla nalezena pouze u 5 pacientů (6 %) a z toho u dvou pacientů opět v kombinaci s potenciálně terapeuticky cílitelnou mutací v genu *ACVR1*. Nejméně častou mutací ve vyšetřované skupině byla mutace G34R genu *H3-3A*, která byla nalezena pouze u 4 pacientů (9 %) a svědčí pro diagnózu difúzního hemisférického gliomu. Úspěšnost nálezů diagnostických změn v rámci celé skupiny vyšetřovaných pacientů byla tedy 100 %.

V rámci vyšetření potenciálně terapeuticky cílitelných změn byla u 7 pacientů (17 %) z celé skupiny identifikovány různé mutace (viz Příloha 2) výše zmíněného genu *ACVR1*. U 2 pacientů (5 %) byla nalezena mutace genu *BRAF* (V600E), která je považována za diagnostickou, ale i terapeuticky cílitelnou změnu. Pouze u 1 pacienta (2 %) byly nalezeny dvě mutace genu *FGFR1*. Celková úspěšnost nálezů potenciálně terapeuticky cílitelných změn byla tedy 24 %.

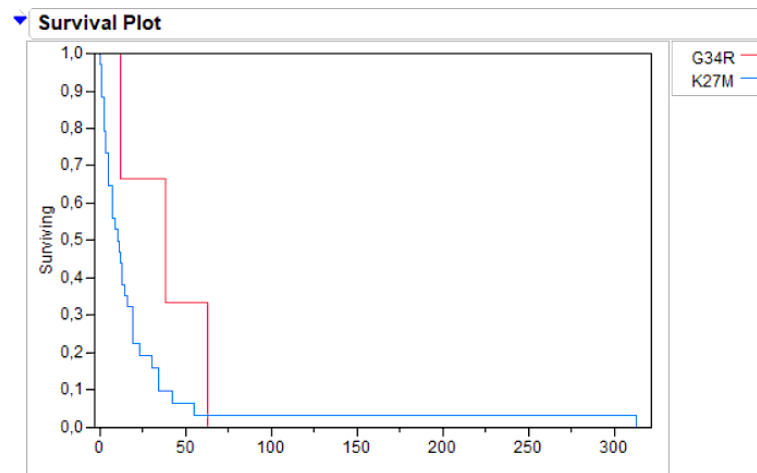
Procentuální podíl mutací vyšetřovaných genů s mutacemi je přehledně zobrazen v Obrázku 17 (graf).





Obrázek 17 - Graf – procentuální podíl mutací vyšetřovaných genů. (Zdroj: vlastní)

Pro zdůraznění důležitosti molekulárně genetické diagnostiky HGG pediatrického typu níže přikládám Kaplan-Maierovy křivky přežití vyšetřovaných pacientů s mutací H3 K27M (modrá křivka) a mutací H3 G34R (červená křivka). Tyto křivky jasně ukazují nepříznivý průběh onemocnění pacientů s HGG.



Obrázek 18 - Graf – Kaplan-Maierovy křivky přežití pediatrických pacientů s diagnózou HGG. (Zdroj: vlastní)

## 7 Diskuse

Pro účely této práce jsem provedla komplexní molekulárně genetickou analýzu DNA u pacientů s high-grade gliomy pediatrického typu podle nové klasifikace WHO z roku 2021. Výsledky této práce podtrhují význam molekulárně genetické diagnostiky v diagnostickém procesu a potenciálně i v léčebném rozhodování u těchto pacientů.

Nejčastější diagnostickou změnou byla mutace K27M v genu *H3-3A*, která byla zjištěna u 61 % pacientů. Toto zjištění je v souladu s literaturou, která tuto mutaci primárně spojuje s nejčastější diagnózou pediatrických high-grade gliomů, a to s diagnózou DIPG nebo DMG. Méně častou, ale stále důležitou změnou byla mutace K27M v genu *H3C2*, zjištěna u 10 % pacientů, což je další významný molekulárně genetický marker pro diagnózu. Jako méně častou změnu je možné zmínit mutaci G34R v genu *H3-3A*, která je typická pro diagnózu difúzního hemisférického gliomu,

V oblasti potenciálně terapeuticky cílitelných změn jsme zaznamenali úspěšnost nálezu targetabilních mutací ve 24 %. Toto zjištění zdůrazňuje potenciál cílené terapie u vybraných skupin pacientů s high-grade gliomy, což by mohlo v budoucnu významně ovlivnit léčebné strategie a zároveň potvrzuje hypotézu této práce.

Významnou terapeuticky cílitelnou změnu představuje mutace V600E v genu *BRAF*. Pacienti s touto změnou mohou profitovat z léčby Dabrafenibem v kombinaci s Trametinibem (Wen et al., 2022).

V případě terapie pacientů se změnou v genu *ACVRI* připadá v úvahu léčba Vendetanibem v kombinaci s Everolimem, která byla prozatím testována na čtyřech pacientech, přičemž předběžné výsledky poukazují na tuto kombinaci jako na možnou klinicky proveditelnou možnost léčby (Carvalho et al., 2022).

Zdokonalení molekulární typizace pacientů a detekce změn v genech *FGFR1-4* bylo doprovázeno vývojem selektivních inhibitorů FGFR (např. erdafitinib, AZD4557 a pemigatinib). Některé z těchto inhibitorů jsou v současné době zkoušeny u pediatrických pacientů, ačkoli je k dispozici málo údajů o klinické účinnosti a jsou omezeny na kazuistiky nebo malé kohorty. Monocentrická studie Debio1347 (inhibitor FGFR1/2/3) u 5 dětských pacientů s rekurentními nebo refrakterními gliomy se změnou v genu *FGFR* prokázala slibné výsledky (Brown et al., 2023).

Pokud jde o možnosti léčby, standardní přístupy zahrnují chirurgický zákrok, radioterapii a chemoterapii. V posledních letech se objevují nové terapeutické možnosti, včetně cílených terapií zaměřených na specifické molekulárně genetické změny.

Je důležité zdůraznit, že pro konečnou diagnózu je každý pediatrický pacient následně vyšetřován pomocí metylace a Next Generation Sequencing (NGS). Tyto techniky hrají klíčovou roli v diagnostickém procesu, umožňují identifikaci dalších genetických a epigenetických změn a poskytují informace nezbytné pro cílenou terapii.

Tato studie měla několik omezení, včetně relativně malého množství vzorků a retrospektivního charakteru. Tyto faktory by mohly ovlivnit statistickou významnost některých výsledků a obecnou aplikovatelnost na širší populaci pacientů.

Vzhledem k významu molekulárně genetické diagnostiky v onkologii je důležité pokračovat v dalším výzkumu zaměřeném na rozvoj nových diagnostických metod a terapeutických přístupů pro pacienty s high-grade gliomy. Budoucí studie by měly zahrnovat větší množství pacientů, longitudinální sledování výsledků léčby a integraci nových molekulárně genetických technologií.

## 8 Závěr

High-grade gliomy představují vzácný, ale závažný typ nádorů centrálního nervového systému u pediatrických pacientů. Diagnostika těchto nádorů je složitá a vyžaduje kombinaci klinických, morfologických a molekulárně genetických metod pro přesné určení diagnózy a stanovení léčebné strategie.

V rámci této bakalářské práce jsme provedli komplexní molekulárně genetickou analýzu high-grade gliomů pediatrického typu dle nové klasifikace WHO z roku 2021. Naše výsledky potvrdily důležitost molekulárně genetické diagnostiky v diagnostickém procesu a významný potenciál cílené terapie u vybraných skupin pacientů.

Zjištěné mutace v genech *IDH1*, *IDH2*, *H3-3A* a *H3C2* byly v souladu s diagnózou high-grade gliomů u pediatrických pacientů. Nejčastěji byla zjištěna mutace K27M v genu *H3-3A*, která je typická pro DIPG/DMG, a méně častá mutace G34R téhož genu, typická pro diagnózu difúzního hemisférického gliomu. Mezi méně časté mutace můžeme zařadit také zjištěnou mutaci K27M genu *H3C2*, která se taktéž může vyskytnout u pacientů s DIPG/DMG.

V oblasti potenciálně terapeuticky cílitelných změn byla identifikována úspěšnost nálezů 24 %, což ukazuje na potenciál cílené terapie u specifických molekulárně genetických změn.

Závěrem je důležité zdůraznit, že pro konečnou diagnózu je nezbytné provádět další vyšetření pomocí metylace a Next Generation Sequencing (NGS), což podtrhuje význam těchto pokročilých molekulárně genetických metod v diagnostice a léčbě high-grade gliomů u pediatrických pacientů.

Výsledky této práce mohou přispět k lepšímu porozumění molekulárních mechanismů a cest k cílené terapii u pacientů s high-grade gliomy, což by mohlo v budoucnu významně ovlivnit léčebné strategie a výsledky pacientů.

Vzhledem k významu této oblasti je nezbytné pokračovat v dalším výzkumu s cílem rozvoje nových diagnostických a terapeutických přístupů, optimalizace léčby a zlepšení prognózy pacientů s high-grade gliomy.

## Seznam použitých zdrojů

1. Aghajan, Y., Levy, M. L., Malicki, D. M., & Crawford, J. R. (2016). Novel PPP1CB-ALK fusion protein in a high-grade glioma of infancy. *BMJ Case Reports*, bcr2016217189. <https://doi.org/10.1136/bcr-2016-217189>
2. Alberts, B. (c1998). *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky* (2. vyd, přeložil Arnošt KOTYK, přeložil Bohumil BOUZEK, přeložil Pavel HOZÁK). Espero.
3. Bergethon, K., Shaw, A. T., Ignatius Ou, S.-H., Katayama, R., Lovly, C. M., McDonald, N. T., Massion, P. P., Siwak-Tapp, C., Gonzalez, A., Fang, R., Mark, E. J., Batten, J. M., Chen, H., Wilner, K. D., Kwak, E. L., Clark, J. W., Carbone, D. P., Ji, H., Engelman, J. A., ... Iafrate, A. J. (2012). *ROS1* Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 30(8), 863–870. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6345>
4. Broniscer, A., Hwang, S. N., Chamdine, O., Lin, T., Pounds, S., Onar-Thomas, A., Chi, L., Shurtleff, S., Allen, S., Gajjar, A., Northcott, P., & Orr, B. A. (2018). Bithalamic gliomas may be molecularly distinct from their unilateral high-grade counterparts. *Brain Pathology*, 28(1), 112–120. <https://doi.org/10.1111/bpa.12484>
5. Brown, L. M., Ekert, P. G., & Fleuren, E. D. G. (2023). Biological and clinical implications of FGFR aberrations in paediatric and young adult cancers. *Oncogene*, 42(23), 1875–1888. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02705-7>
6. Buczkowicz, P., Bartels, U., Bouffet, E., Becher, O., & Hawkins, C. (2014). Histopathological spectrum of paediatric diffuse intrinsic pontine glioma: Diagnostic and therapeutic implications. *Acta Neuropathologica*, 128(4), 573–581. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1319-6>
7. Büchler, T. (2023). *Klinická onkologie*. Maxdorf.
8. Carvalho, D. M., Richardson, P. J., Olaciregui, N., Stankunaite, R., Lavarino, C., Molinari, V., Corley, E. A., Smith, D. P., Ruddle, R., Donovan, A., Pal, A., Raynaud, F. I., Temelso, S., Mackay, A., Overington, J. P., Phelan, A., Sheppard, D., Mackinnon, A., Zebian, B., ... Jones, C. (2022). Repurposing Vandetanib plus

Everolimus for the Treatment of *ACVR1* -Mutant Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Discovery*, 12(2), 416–431. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1201>

9. Castel, D., Kergrohen, T., Tauziède-Espariat, A., Mackay, A., Ghermaoui, S., Lechapt, E., Pfister, S. M., Kramm, C. M., Boddaert, N., Blauwblomme, T., Puget, S., Beccaria, K., Jones, C., Jones, D. T. W., Varlet, P., Grill, J., & Debily, M.-A. (2020). Histone H3 wild-type DIPG/DMG overexpressing EZHIP extend the spectrum diffuse midline gliomas with PRC2 inhibition beyond H3-K27M mutation. *Acta Neuropathologica*, 139(6), 1109–1113. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02142-w>
10. Castel, D., Philippe, C., Kergrohen, T., Sill, M., Merlevede, J., Barret, E., Puget, S., Sainte-Rose, C., Kramm, C. M., Jones, C., Varlet, P., Pfister, S. M., Grill, J., Jones, D. T. W., & Debily, M.-A. (2018). Transcriptomic and epigenetic profiling of ‘diffuse midline gliomas, H3 K27M-mutant’ discriminate two subgroups based on the type of histone H3 mutated and not supratentorial or infratentorial location. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0614-1>
11. Clarke, M., Mackay, A., Ismer, B., Pickles, J. C., Tatevossian, R. G., Newman, S., Bale, T. A., Stoler, I., Izquierdo, E., Temelso, S., Carvalho, D. M., Molinari, V., Burford, A., Howell, L., Virasami, A., Fairchild, A. R., Avery, A., Chalker, J., Kristiansen, M., ... Jones, C. (2020). Infant High-Grade Gliomas Comprise Multiple Subgroups Characterized by Novel Targetable Gene Fusions and Favorable Outcomes. *Cancer Discovery*, 10(7), 942–963. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1030>
12. Coccé, M. C., Mardin, B. R., Bens, S., Stütz, A. M., Lubieniecki, F., Vater, I., Korb, J. O., Siebert, R., Alonso, C. N., & Gallego, M. S. (2016). Identification of *ZCCHC8* as fusion partner of *ROSI* in a case of congenital glioblastoma multiforme with a t(6;12)(q21;q24.3). *Genes, Chromosomes and Cancer*, 55(9), 677–687. <https://doi.org/10.1002/gcc.22369>
13. Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and

molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>

14. Drilon, A., Cappuzzo, F., Ou, S.-H. I., & Camidge, D. R. (2017). Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *Journal of Thoracic Oncology*, 12(1), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.10.014>
15. Duffner, P. K., Horowitz, M. E., Krischer, J. P., Burger, P. C., Cohen, M. E., Sanford, R. A., Friedman, H. S., & Kun, L. E. (1999). The treatment of malignant brain tumors in infants and very young children: An update of the Pediatric Oncology Group experience. *Neuro-Oncology*, 1(2), 152–161. <https://doi.org/10.1093/neuonc/1.2.152>
16. Gessi, M., Gielen, G. H., Dreschmann, V., Waha, A., & Pietsch, T. (2015). High frequency of H3F3A K27M mutations characterizes pediatric and adult high-grade gliomas of the spinal cord. *Acta Neuropathologica*, 130(3), 435–437. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1463-7>
17. Gianno, F., Giovannoni, I., Cafferata, B., Diomedi-Camassei, F., Minasi, S., Barresi, S., Buttarelli, F. R., Alesi, V., Cardoni, A., Antonelli, M., Puggioni, C., Colafati, G. S., Carai, A., Vinci, M., Mastronuzzi, A., Miele, E., Alaggio, R., Giangaspero, F., & Rossi, S. (2022). Paediatric-type diffuse high-grade gliomas in the 5th CNS WHO Classification. *Pathologica*, 114(6), 422–435. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-830>
18. Gilbert, A. R., Zaky, W., Gokden, M., Fuller, C. E., Ocal, E., Leeds, N. E., & Fuller, G. N. (2018). Extending the Neuroanatomic Territory of Diffuse Midline Glioma, K27M Mutant: Pineal Region Origin. *Pediatric Neurosurgery*, 53(1), 59–63. <https://doi.org/10.1159/000481513>
19. Greten, T. F. (2017). Does CSF1R Blockade Turn into Friendly Fire? *Cancer Cell*, 32(5), 546–547. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.10.012>
20. Guarnaccia, M., Guarnaccia, L., La Cognata, V., Navone, S., Campanella, R., Ampollini, A., Locatelli, M., Miozzo, M., Marfia, G., & Cavallaro, S. (2022). A Targeted Next-Generation Sequencing Panel to Genotype Gliomas. *Life*, 12(7), 956. <https://doi.org/10.3390/life12070956>

21. Guerreiro Stucklin, A. S., Ryall, S., Fukuoka, K., Zapotocky, M., Lassaletta, A., Li, C., Bridge, T., Kim, B., Arnoldo, A., Kowalski, P. E., Zhong, Y., Johnson, M., Li, C., Ramani, A. K., Siddaway, R., Nobre, L. F., De Antonellis, P., Dunham, C., Cheng, S., ... Hawkins, C. (2019). Alterations in ALK/ROS1/NTRK/MET drive a group of infantile hemispheric gliomas. *Nature Communications*, 10(1), 4343. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12187-5>
22. Gupta, N. (2019). DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology*, 36(2), 116. [https://doi.org/10.4103/JOC.JOC\\_110\\_18](https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18)
23. Heimberger, A. B., Suki, D., Yang, D., Shi, W., & Aldape, K. (2005). The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *Journal of Translational Medicine*, 3(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-38>
24. Hoffman, L. M., Veldhuijzen Van Zanten, S. E. M., Colditz, N., Baugh, J., Chaney, B., Hoffmann, M., Lane, A., Fuller, C., Miles, L., Hawkins, C., Bartels, U., Bouffet, E., Goldman, S., Leary, S., Foreman, N. K., Packer, R., Warren, K. E., Broniscer, A., Kieran, M. W., ... Fouladi, M. (2018). Clinical, Radiologic, Pathologic, and Molecular Characteristics of Long-Term Survivors of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG): A Collaborative Report From the International and European Society for Pediatric Oncology DIPG Registries. *Journal of Clinical Oncology*, 36(19), 1963–1972. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.9308>
25. Chai, R.-C., Zhang, Y.-W., Liu, Y.-Q., Chang, Y.-Z., Pang, B., Jiang, T., Jia, W.-Q., & Wang, Y.-Z. (2020). The molecular characteristics of spinal cord gliomas with or without H3 K27M mutation. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00913-w>
26. Justin, N., Zhang, Y., Tarricone, C., Martin, S. R., Chen, S., Underwood, E., De Marco, V., Haire, L. F., Walker, P. A., Reinberg, D., Wilson, J. R., & Gambin, S. J. (2016). Structural basis of oncogenic histone H3K27M inhibition of human polycomb repressive complex 2. *Nature Communications*, 7(1), 11316. <https://doi.org/10.1038/ncomms11316>



27. Kasper, L. H., & Baker, S. J. (2020). Invited Review: Emerging functions of histone H3 mutations in paediatric diffuse high-grade gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 46(1), 73–85. <https://doi.org/10.1111/nan.12591>
28. Kočárek, E. (2007). *Molekulární biologie v medicíně* (Vyd. 1). Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně.
29. Korshunov, A., Capper, D., Reuss, D., Schrimpf, D., Ryzhova, M., Hovestadt, V., Sturm, D., Meyer, J., Jones, C., Zheludkova, O., Kumirova, E., Golanov, A., Kool, M., Schüller, U., Mittelbronn, M., Hasselblatt, M., Schittenhelm, J., Reifenberger, G., Herold-Mende, C., ... Jones, D. T. W. (2016). Histologically distinct neuroepithelial tumors with histone 3 G34 mutation are molecularly similar and comprise a single nosologic entity. *Acta Neuropathologica*, 131(1), 137–146. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1493-1>
30. Korshunov, A., Schrimpf, D., Ryzhova, M., Sturm, D., Chavez, L., Hovestadt, V., Sharma, T., Habel, A., Burford, A., Jones, C., Zheludkova, O., Kumirova, E., Kramm, C. M., Golanov, A., Capper, D., Von Deimling, A., Pfister, S. M., & Jones, D. T. W. (2017). H3-/IDH-wild type pediatric glioblastoma is comprised of molecularly and prognostically distinct subtypes with associated oncogenic drivers. *Acta Neuropathologica*, 134(3), 507–516. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1710-1>
31. Lezcano, C., Shoushtari, A. N., Ariyan, C., Hollmann, T. J., & Busam, K. J. (2018). Primary and Metastatic Melanoma With NTRK Fusions. *American Journal of Surgical Pathology*, 42(8), 1052–1058. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001070>
32. Lin, J. J., Riely, G. J., & Shaw, A. T. (2017). Targeting ALK: Precision Medicine Takes on Drug Resistance. *Cancer Discovery*, 7(2), 137–155. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1123>
33. López, G. Y., Van Ziffle, J., Onodera, C., Grenert, J. P., Yeh, I., Bastian, B. C., Clarke, J., Oberheim Bush, N. A., Taylor, J., Chang, S., Butowski, N., Banerjee, A., Mueller, S., Kline, C., Torkildson, J., Samuel, D., Siongco, A., Raffel, C., Gupta, N., ... Solomon, D. A. (2019). The genetic landscape of gliomas arising

after therapeutic radiation. *Acta Neuropathologica*, 137(1), 139–150.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1906-z>

34. Mackay, A., Burford, A., Carvalho, D., Izquierdo, E., Fazal-Salom, J., Taylor, K. R., Bjerke, L., Clarke, M., Vinci, M., Nandhabalan, M., Temelso, S., Popov, S., Molinari, V., Raman, P., Waanders, A. J., Han, H. J., Gupta, S., Marshall, L., Zacharoulis, S., ... Jones, C. (2017). Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell*, 32(4), 520-537.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.08.017>
35. Meyronet, D., Esteban-Mader, M., Bonnet, C., Joly, M.-O., Uro-Coste, E., Amiel-Benouaich, A., Forest, F., Rousselot-Denis, C., Burel-Vandenbos, F., Bourg, V., Guyotat, J., Fenouil, T., Jouvet, A., Honnorat, J., & Ducray, F. (2017). Characteristics of H3 K27M-mutant gliomas in adults. *Neuro-Oncology*, 19(8), 1127–1134. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now274>
36. Ng, A., Levy, M. L., Malicki, D. M., & Crawford, J. R. (2019). Unusual high-grade and low-grade glioma in an infant with PPP1CB-ALK gene fusion. *BMJ Case Reports*, 12(2), e228248. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-228248>
37. Nikiforova, M. N., & Hamilton, R. L. (2011). Molecular Diagnostics of Gliomas. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(5), 558–568. <https://doi.org/10.5858/2010-0649-RAIR.1>
38. Olsen, T. K., Panagopoulos, I., Meling, T. R., Micci, F., Gorunova, L., Thorsen, J., Due-Tønnessen, B., Scheie, D., Lund-Iversen, M., Krossnes, B., Saxhaug, C., Heim, S., & Brandal, P. (2015). Fusion genes with *ALK* as recurrent partner in ependymoma-like gliomas: A new brain tumor entity? *Neuro-Oncology*, 17(10), 1365–1373. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov039>
39. Pathania, M., De Jay, N., Maestro, N., Harutyunyan, A. S., Nitarska, J., Pahlavan, P., Henderson, S., Mikael, L. G., Richard-Londt, A., Zhang, Y., Costa, J. R., Hébert, S., Khazaei, S., Ibrahim, N. S., Herrero, J., Riccio, A., Albrecht, S., Ketteler, R., Brandner, S., ... Salomoni, P. (2017). H3.3K27M Cooperates with Trp53 Loss and PDGFRA Gain in Mouse Embryonic Neural Progenitor Cells to

Induce Invasive High-Grade Gliomas. *Cancer Cell*, 32(5), 684-700.e9.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.014>

40. Penka, M., & Slavičková, E. (2011). *Hematologie a transfuzní lékařství. I. Hematologie* (1. vyd). Grada.
41. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2019). Molecular Pathways: Divergent Roles of G Protein–Coupled Receptor Kinases in Tumor Cell Migration and Tumor Angiogenesis. *Clinical Cancer Research*, 25(14), 4424-4429.
42. Roux, A., Pallud, J., Saffroy, R., Edjlali-Goujon, M., Debily, M.-A., Boddart, N., Sanson, M., Puget, S., Knafo, S., Adam, C., Faillot, T., Cazals-Hatem, D., Mandonnet, E., Polivka, M., Dorfmueller, G., Dauta, A., Desplanques, M., Gareton, A., Pages, M., ... Varlet, P. (2020). High-grade gliomas in adolescents and young adults highlight histomolecular differences from their adult and pediatric counterparts. *Neuro-Oncology*, 22(8), 1190–1202.  
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa024>
43. Russo, A., Franchina, T., Ricciardi, G. R. R., & Adamo, V. (2017). Rapid Acquisition of T790M Mutation after Treatment with Afatinib in an NSCLC Patient Harboring EGFR Exon 20 S768I Mutation. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(1), e6–e8. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.09.132>
44. Ryall, S., Krishnatry, R., Arnoldo, A., Buczkowicz, P., Mistry, M., Siddaway, R., Ling, C., Pajovic, S., Yu, M., Rubin, J. B., Hukin, J., Steinbok, P., Bartels, U., Bouffet, E., Tabori, U., & Hawkins, C. (2016). Targeted detection of genetic alterations reveal the prognostic impact of H3K27M and MAPK pathway aberrations in paediatric thalamic glioma. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0353-0>
45. Solomon, D. A., Wood, M. D., Tihan, T., Bollen, A. W., Gupta, N., Phillips, J. J. J., & Perry, A. (2016). Diffuse Midline Gliomas with Histone H3-K27M Mutation: A Series of 47 Cases Assessing the Spectrum of Morphologic Variation and Associated Genetic Alterations. *Brain Pathology*, 26(5), 569–580.  
<https://doi.org/10.1111/bpa.12336>

46. Staněk, L., Soumarová, R., & Gürlich, R. (2023). *Molekulární diagnostika nádorů pro chirurgické obory* (1. vydání). Current Media.
47. Steffen-Smith, E. A., Baker, E. H., Venzon, D., Shandilya, S., Bent, R. S., & Warren, K. E. (2014). Measurements of the pons as a biomarker of progression for pediatric DIPG. *Journal of Neuro-Oncology*, *116*(1), 127–133. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1266-4>
48. Steinbok, P., Gopalakrishnan, C. V., Hengel, A. R., Vitali, A. M., Poskitt, K., Hawkins, C., Drake, J., Lamberti-Pasculli, M., Ajani, O., Hader, W., Mehta, V., McNeely, P. D., McDonald, P. J., Ranger, A., Vassilyadi, M., Atkinson, J., Ryall, S., Eisenstat, D. D., & Hukin, J. (2016). Pediatric thalamic tumors in the MRI era: A Canadian perspective. *Child's Nervous System*, *32*(2), 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00381-015-2968-z>
49. Tauziède-Espariat, A., Debily, M.-A., Castel, D., Grill, J., Puget, S., Sabel, M., Blomgren, K., Gareton, A., Dangouloff-Ros, V., Lechapt, E., Boddaert, N., & Varlet, P. (2019). An integrative radiological, histopathological and molecular analysis of pediatric pontine histone-wildtype glioma with MYCN amplification (HGG-MYCN). *Acta Neuropathologica Communications*, *7*(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0738-y>
50. Valera, E. T., Neder, L., Queiroz, R. G., Santos, A. C., Sousa, G. R., Oliveira, R. S., Santos, M. V., Machado, H. R., & Tone, L. G. (2020). Perinatal complex low- and high-grade glial tumor harboring a novel *GIGYF2-ALK* fusion. *Pediatric Blood & Cancer*, *67*(1), e28015. <https://doi.org/10.1002/pbc.28015>
51. Van Dongen, J. J. M., Langerak, A. W., Brüggemann, M., Evans, P. A. S., Hummel, M., Lavender, F. L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., García-Sanz, R., Van Krieken, J. H. J. M., Droese, J., González, D., Bastard, C., White, H. E., Spaargaren, M., González, M., Parreira, A., Smith, J. L., ... Macintyre, E. A. (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, *17*(12), 2257–2317. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403202>

52. Vettermann, F. J., Felsberg, J., Reifenberger, G., Hasselblatt, M., Forbrig, R., Berding, G., La Fougère, C., Galldiks, N., Schittenhelm, J., Weis, J., Albert, N. L., & Schüller, U. (2018). Characterization of Diffuse Gliomas With Histone H3-G34 Mutation by MRI and Dynamic 18F-FET PET. *Clinical Nuclear Medicine*, 43(12), 895–898. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000002300>
53. *WHO Classification of Tumours online*. Retrieved April 6, 2024, from <https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/45/8>
54. *WHO Classification of Tumours online*. Retrieved April 6, 2024, from <https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/45/9>
55. Wen, P. Y., Stein, A., Van Den Bent, M., De Greve, J., Wick, A., De Vos, F. Y. F. L., Von Bubnoff, N., Van Linde, M. E., Lai, A., Prager, G. W., Campone, M., Fasolo, A., Lopez-Martin, J. A., Kim, T. M., Mason, W. P., Hofheinz, R.-D., Blay, J.-Y., Cho, D. C., Gazzah, A., ... Subbiah, V. (2022). Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAFV600E-mutant low-grade and high-grade glioma (ROAR): A multicentre, open-label, single-arm, phase 2, basket trial. *The Lancet Oncology*, 23(1), 53–64. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00578-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00578-7)
56. Yuen, B. T. K., & Knoepfler, P. S. (2013). Histone H3.3 Mutations: A Variant Path to Cancer. *Cancer Cell*, 24(5), 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.015>
57. Zámečník, J. (Ed.). (2019). *Patologie* (První vydání). LD Prager Publishing.

## 9 Přílohy

*Příloha 1 – tabulka primerů použitých pro kontrolu kvality DNA pomocí multiplexové PCR (CTRL).*

<b>Primer</b>	<b>Sekvence</b>
<b>TBXAS1/X9L</b>	5'-GGT GTT GCC GGG AAG GGT T-3'
<b>TBXAS1/X9U</b>	5'-GCC CGA CAT TCT GCA AGT CC-3'
<b>AF4/X3L</b>	5'-CAT CCA TGG GCC GGA CAT AA-3'
<b>AF4/X3U</b>	5'-GGA GCA GCA TTC CAT CCA GC-3'
<b>AF4/X11U</b>	5'-CCG CAG CAA GCA ACG AAC C-3'
<b>PLZF/X1U</b>	5'-TGC GAT GTG GTC ATC ATG GTG-3'
<b>PLZF/X1L</b>	5'-CGT GTC ATT GTC GTC TGA GGC-3'
<b>RAG1/X2U</b>	5'-TGT GTG ACT CGA TCC ACC CCA-3'
<b>RAG1/X2L</b>	5'-TAG GCT GCA AGT TTG GCT GAA-3'
<b>AF4/X11L</b>	5'-GCT TTC CTC TGG CGG CTC C-3'

*(Zdroj: Van Dongen et al., 2003)*

*Příloha 2 – tabulka primerů a jejich sekvencí použitých pro PCR reakce.*

<b>Primer</b>	<b>Sekvence</b>
<b>IDH1 F</b>	5'-CTC CTG ATG AGA AGA GGG TTG-3'
<b>IDH1 R</b>	5'-TGG AAA TTT CTG GGC CAT G-3'
<b>H3F3A F</b>	5'-GCT GCA GTG GGA CCA CTA TT-3'
<b>H3F3A E</b>	5'-TGT GGC CTT GTA CTG CAG AG-3'
<b>H3C2 F</b>	5'-AAA TCG ACC GGT GGT AAA GC-3'
<b>H3C2 R</b>	5'-ATA CAA GAG AGA CTT TGT CCC A-3'
<b>BRAF F</b>	5'-TTG GTG GTC TGA CTC TAT AA-3'
<b>BRAF R</b>	5'-CGG TAA CGG TGA GGC TTT T-3'
<b>ACVR1 exon 6 F</b>	5'-CCC CCT TGT CTT AAA CCA CA-3
<b>ACVR1 exon 6 R</b>	5'-TGC ATA TTA CCC ACA AAG AAA GG-3'
<b>ACVR1 exon 7 F</b>	5'-GGA GAA TGT TGC CGT GAA GA-3
<b>ACVR1 exon 7 R</b>	5'-CCA AAA CGG AGA GAG CAA AG-3'
<b>ACVR1 exon 8 F</b>	5'-TGC CTT CGA ATA GTG CTG TC-3'
<b>ACVR1 exon 8 R</b>	5'-CCC AAA TCT GCT ATG CAA CA-3
<b>FGFR1 exon 12 F</b>	5'-ACC CCA GCT CAG ATC TTC TC-3'
<b>FGFR1 exon 12 R</b>	5'-AGA GAA AGA CTT GTC AGA CC-3'
<b>FGFR1 exon 14 F</b>	5'-CCA CCC CAC TCC TTG CTT-3'
<b>FGFR1 exon 14 R</b>	5'-GGT GAC AGA GGA CAA TGT GA-3'

*Zdroj: vlastní*

Příloha 3 – přehledná tabulka vyšetřovaných pacientů.

Označení	Věk DGN (r)	Materiál	DGN	IDH1	IDH2	H3-3A	H3C2	BRAF	ACVR1	FGFR1
Pacient 1	3	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 2	6	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 3	7	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 4	4	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 5	19	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 6	5	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 7	14	pf	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 8	13	mr	DIPG	wt	wt	wt	K27M	wt	wt	wt
Pacient 9	5	mr	DIPG	wt	wt	wt	K27M	wt	wt	wt
Pacient 10	4	pf	DIPG	wt	wt	wt	K27M	wt	wt	wt
Pacient 11	3	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 12	6	pf	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 13	2	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 14	11	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 15	4	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 16	7	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 17	6	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 18	13	pf	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 19	9,5	pf	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 20	2	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 21	15	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 22	4,5	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 23	4	pf	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 24	9	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 25	9	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 26	9,5	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 27	14	mr	DMG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 28	14	pf	DMG	wt	wt	K27M	wt	wt	wt	wt
Pacient 29	4	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	G328E	wt
Pacient 30	5	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	G328W	wt
Pacient 31	3	pf	DIPG	wt	wt	wt	K27M	wt	G328E	wt
Pacient 32	4	mr	DIPG	wt	wt	wt	K27M	wt	R258G	wt
Pacient 33	11	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	N546D	wt
Pacient 34	8	pf	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	G328E	wt
Pacient 35	14	mr	DIPG	wt	wt	K27M	wt	wt	R206H	wt
Pacient 36	19	pf	dif. hem. gliom	wt	wt	G34R	wt	wt	wt	wt
Pacient 37	12	mr	dif. hem. gliom	wt	wt	G34R	wt	wt	wt	wt
Pacient 38	10	mr	dif. hem. gliom	wt	wt	G34R	wt	wt	wt	wt

Pacient 39	16	mr	PXA grade 4	wt	wt	G34R	wt	wt	wt	wt
Pacient 40	15	pf	PXA grade 4	wt	wt	wt	wt	V600E	wt	wt
Pacient 41	12	mr	pHGG H3- wt IDH-wt	wt	wt	wt	wt	V600E	wt	wt
Pacient 42	0,75	mr	pHGG H3- wt IDH-wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	K656E V561M

*Zdroj: vlastní*



## 10 Seznam obrázků

Obrázek 1 - mikroskopický obraz DIPG vykazující infiltrativní neoplastické buňky na edematózním pozadí s reziduálními neurony (Zdroj: Varlet, 2022).....	12
Obrázek 2 - mikroskopický obraz difúzního hemisférického gliomu H3 G34-alterovaného ukazující palisádovitou nekrózu (Zdroj: Leske, 2022). .....	14
Obrázek 3 - mikroskopický obraz pHG H3-wildtype a IDH-wildtype – nádor je vysoce buněčný, připomínající embryonální morfologii a vykazující ostré ohraničení od mozkové tkáně (Zdroj: Varlet, 2022).....	16
Obrázek 4 - mikroskopický obraz hemisférického gliomu infantilního typu vykazující klasické rysy HGG včetně palisádovité nekrózy a proliferace endotelu (Zdroj: Hawkins, 2022). .....	18
Obrázek 5 - průhledná fáze (nahore) s obsahem RNA a růžová fáze (dole) s obsahem DNA. (Zdroj: vlastní) .....	30
Obrázek 6 - vizualizace amplifikace genů CTRL (1–3; 4 – pozitivní kontrola) pomocí agarózové elektroforézy; L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola (Zdroj: vlastní).....	33
Obrázek 7 - Vizualizace PCR produktů genů IDH1 (1) a IDH2 (2); L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola. (Zdroj: vlastní) .....	39
Obrázek 8 - Vizualizace PCR produktů genů H3-3A (1) a H3C2 (2); L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola. (Zdroj: vlastní) .....	39
Obrázek 9 - Vizualizace PCR produktu genu BRAF (1); L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola. (Zdroj: vlastní).....	40
Obrázek 10 - Vizualizace PCR produktů genů ACVR1 – 1 - exon 6; 2 - exon 7; 3 - exon 8; L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola. (Zdroj: vlastní) .....	40
Obrázek 11 - Vizualizace PCR produktů genů FGFR1 – 1 - exon 12; 2 - exon 14; L – velikostní marker (ladder); NC – negativní kontrola. (Zdroj: vlastní) .....	40
Obrázek 12 - Sekvenční elektroforetogram genu H3-3A – šipka ukazuje místo mutace.....	46
Obrázek 13 - Sekvenční elektroforetogram genu H3-3A – šipka ukazuje místo mutace.....	46
Obrázek 14 - Sekvenční elektroforetogram genu FGFR1 – šipka ukazuje místo mutace.....	46
Obrázek 15 - Sekvenční elektroforetogram mutace genu BRAF – šipka ukazuje místo mutace BRAF(ENST00000646891.2):c.1799T>A p.(Val600Glu)/V600E. (Zdroj: vlastní).....	46
Obrázek 16 - Sekvenční elektroforetogram mutace genu ACVR1 – šipka ukazuje místo mutace ACVR1(NM_001111067.4):c.983G>Tp.(Gly328Val). (Zdroj: vlastní).....	47
Obrázek 17 - Graf – procentuální podíl mutací vyšetřovaných genů. (Zdroj: vlastní).....	49
Obrázek 18 - Graf – Kaplan-Maierovy křivky přežití pediatrických pacientů s diagnózou HGG. (Zdroj: vlastní) .....	49

## 11 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Složení master mixu pro amplifikaci genů CTRL a jednu reakci. ....	35
Tabulka 2 - Reakční profil pro amplifikaci kontrolních genů CTRL v termocykleru. (Zdroj: vlastní) .....	35
Tabulka 3 - Složení master mixu společné pro vyšetření mutací požadovaných genů. (Zdroj: vlastní) .....	37
Tabulka 4 - Reakční profil pro amplifikaci vyšetřovaných genů v termocykleru. (Zdroj: vlastní) .....	37
Tabulka 5 - Složení master mixu pro přípravu sekvenační reakce. (Zdroj: vlastní).....	44
Tabulka 6 - Reakční profil sekvenační reakce společný pro vyšetření všech mutací (termocykler). (Zdroj: vlastní) .....	44

## 12 Seznam zkratek

ACVR1 – receptor aktivinu A typu I

ALK – anaplastic lymphoma receptor

ATRX – alpha-thalassemia mental retardation X-linked gene

BRAF – protoonkogen B-Raf

BDT – BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (BDT)

BP – base pairs (páry bází)

CNS – centrální nervový systém

DGN – diagnóza

DIPG – diffuse intrinsic pontine glioma (difúzní intrinsický pontinní gliom)

DMG – diffuse midline glioma (difúzní středočárový gliom)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ddNTP – dideoxyribonukleotid trifosfát

dsDNA – double stranded DNA (dvouvláknová DNA)

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor

EZH1P – Enhancer of Zeste Homolog Inhibitory Protein

F – forward (primer)

FFPE – Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (vzorek fixovaný ve formaldehydu a zalitý v parafínu)

FGFR1 – Fibroblast Growth Factor Receptor 1

HGG – high-grade gliom

IDH – isocitrát dehydrogenáza

LIS – laboratorní informační systém

MET – Tyrosine-Protein Kinase Met

MGMT – O6-methylguanine – DNA methyltransferase

mr – mražený vzorek

NK – nukleová kyselina

NTRK – Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase

PDGFRA – Platelet Derived Growth Factor Receptor A

pf – vzorek FFPE

pHGG – diffuse paediatric type high-grade glioma (difúzní high-grade gliom pediatrického typu)

pHGG H3/IDH WT – difúzní high-grade gliom pediatrického typu H3-wildtype, IDH-wildtype

PXA – Pleomorphix Xanthoastrocytoma (pleomorfní xantoastrocytom)

r – roky

R – reverse (primer)

RIG – radioterapií indukovaný gliom

ROS1 – ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase

RPM – revolutions per minute (otáčky za minutu)

RTK – receptor tyrozinkináz

TBE – tris-borát-EDTA (pufr)

TP53 – Tumor protein p53

WHO – World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

WT – wild type (nemutovaná forma genu)