



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Detekce somatických mutací a vybraných
cytogenetických změn u gliomů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Barbora Svatošová
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Odborný školitel: RNDr. Magdalena Uvírová, Ph.D., EUC laboratoře CGB a.s.
Termín odevzdání práce: 2023

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

| | |
|--------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora: | Barbora Svatošová |
| Název práce: | Detekce somatických mutací a vybraných cytogenetických změn u gliomů |
| Typ práce: | Bakalářská |
| Pracoviště: | Laboratoř růstových regulátorů |
| Vedoucí práce: | MUDr. Josef Srovnal, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce: | 2023 |
| Abstrakt: | <p>Tato bakalářská práce se zabývá molekulárně-genetickými mutacemi u nejagresivnější skupiny mozkových nádorů. Gliomy postihují centrální nervovou soustavu, zejména mozkový parenchym, a vyznačují se vysokou heterogenitou. Infiltrativně difúzní gliomy zároveň disponují schopností šířit se do okolní zdravé tkáně, což znemožňuje jejich úplné odstranění a charakteristická je pro ně i značná rezistence k dosud dostupné léčbě. Klíčem k dobře cílené terapii se zdají být molekulárně-genetické markery. Cílem této práce bylo získat vědomosti v oblasti molekulárně-genetických aberací u jednotlivých nádorových typů spadajících do rodiny difúzních gliomů dospělého typu. V závislosti na změně klasifikačních zvyklostí bylo cílem práce stratifikovat kohortu patientských vzorků z rozmezí let (2018 – 2022) podle nové Klasifikace nádorů centrální nervové soustavy vydané WHO v roce 2021 (WHO CNS5 2021), současně doplnit vyšetření mutací v promotoru genu <i>TERT</i> pomocí metody SNaPshot assay a provést hodnocení nejčastějších molekulárních a genetických změn u těchto vzorků.</p> |
| Klíčová slova: | Astrocytom, Oligodendrogliom, Glioblastom, SNaPshot assay, WHO CNS5 2021 |
| Počet stran: | 61 |
| Počet příloh: | 0 |
| Jazyk: | Český |

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

| | |
|----------------------------------|---|
| Author's first name and surname: | Barbora Svatošová |
| Title of thesis: | Detection of somatic mutations and selected cytogenetic changes in gliomas |
| Type of thesis: | Bachelor |
| Department: | Laboratory of Growth Regulators |
| Supervisor: | MUDr. Josef Srovnal, Ph.D. |
| The year of presentation: | 2023 |
| Abstract: | <p>This bachelor thesis deals with molecular and genetic mutations in the most aggressive group of brain tumors. Gliomas affect the central nervous system, especially the brain parenchyma, and are characterized by high heterogeneity. Infiltrative-diffuse gliomas also have the ability to spread to surrounding healthy tissue, which makes their complete removal impossible, and they are characterized by significant resistance to currently available treatments. Molecular genetic markers appear to be the key to well-targeted therapy. The goal of this study was to gain knowledge in the field of molecular genetic aberrations in different tumor types belonging to the family of Adult Diffuse Gliomas. Depending on the change in classification practices, the goal of this work was to stratify a cohort of patient samples from a range of years (2018 - 2022) according to the new Classification of Central Nervous System Tumors published by the WHO in 2021 (WHO CNS5 2021), and at the same time to supplement samples with the examination of mutations in the <i>TERT</i> gene promoter using the SNaPshot assay method and to perform an evaluation of the most frequent molecular and genetic alterations in these samples.</p> |
| Keywords: | Astrocytoma, Oligodendroglioma, Glioblastoma, SNaPshot assay, WHO CNS5 2021 |
| Number of pages: | 61 |
| Number of appendices: | 0 |
| Language: | Czech |

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 10. 5. 2023

.....
Barbora Svatošová

Poděkování

Bakalářská práce vznikla za podpory projektu „Analýza českých genomů pro teranostiku“, reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448 financovaného z EFRR a IGA_LF UP_2023_006. Ráda bych poděkovala vedoucímu práce MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D., za odborné vedení, ochotu a trpělivost při zpracovávání mé bakalářské práce. Současně bych chtěla poděkovat Mgr. Ireně Urbanovské za cenné rady v oblasti řešené problematiky a také EUC laboratoři CGB, a.s., Ostrava za možnost provedení bakalářské práce na jejich pracovišti.

OBSAH

| | |
|--|----|
| Seznam zkratek | 8 |
| 1 ÚVOD | 10 |
| 2 CÍLE PRÁCE..... | 11 |
| 3 TEORETICKÁ ČÁST | 12 |
| 3.1 Charakteristika gliomů..... | 12 |
| 3.2 Klasifikace gliomů dle WHO | 13 |
| 3.2.1 Klasifikace gliomů podle typu..... | 13 |
| 3.2.2 Grading | 14 |
| 3.3 Difúzní gliomy dospělého typu..... | 15 |
| 3.4 Astrocytom, IDH-mutant | 16 |
| 3.4.1 Grading | 16 |
| 3.4.2 Molekulární vlastnosti a genetický profil nádoru | 17 |
| 3.4.2.1 Mutace v genech isocitrátdehydrogenázy 1 a 2..... | 17 |
| 3.4.2.2 Alterace genu <i>ATRX</i> a genu <i>TP53</i> | 18 |
| 3.4.2.3 Alterace inhibitoru cyklin-dependentní kinázy 2A/2B..... | 18 |
| 3.5 Oligodendrogliom, IDH-mutant, s kodelečí 1p/19q | 19 |
| 3.5.1 Grading | 19 |
| 3.5.2 Molekulární vlastnosti a genetický profil nádoru | 19 |
| 3.5.2.1 Mutace v genech isocitrátdehydrogenázy 1 a 2..... | 19 |
| 3.5.2.2 Chromozomová kodelece 1p/19q | 20 |
| 3.5.2.3 Mutace promotoru telomerázové reverzní transkriptázy | 21 |
| 3.6 Glioblastom, IDH-wildtype | 22 |
| 3.6.1 Grading | 22 |
| 3.6.2 Molekulární vlastnosti a genetický profil nádoru | 22 |
| 3.6.2.1 Mutace v genech isocitrátdehydrogenázy 1 a 2..... | 22 |
| 3.6.2.2 Mutace promotoru telomerázové reverzní transkriptázy | 23 |
| 3.6.2.3 Numerické alterace chromozomu 7 a 10..... | 23 |
| 3.6.2.4 Alterace v genu pro fosfatázu a homolog tenzinu | 23 |
| 3.6.2.5 Alterace genu pro receptor epidermálního růstového faktoru | 23 |
| 3.7 Epigenetické markery | 25 |
| 3.7.1 Metylace promotoru genu O ⁶ -methylguanin-DNA-methyltransferasy | 25 |
| 3.8 Molekulární a genetická diagnostika gliomů..... | 25 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.8.1 | Polymerázová řetězcová reakce (PCR) včetně metylačně specifické PCR ... | 26 |
| 3.8.2 | Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace | 27 |
| 3.8.3 | SNaPshot assay | 27 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 29 |
| 4.1 | Analýza mutace promotoru <i>TERT</i> | 29 |
| 4.1.1 | Biologický materiál..... | 29 |
| 4.1.2 | Chemikálie | 29 |
| 4.1.3 | Přístrojové vybavení | 30 |
| 4.1.4 | Metody | 31 |
| 4.1.4.1 | PCR pro test SNaPshot..... | 31 |
| 4.1.4.2 | Elektroforéza PCR produktu | 32 |
| 4.1.4.3 | Přečištění PCR produktu | 33 |
| 4.1.4.4 | SNaPshot reakce | 33 |
| 4.1.4.5 | Přečištění SNaPshot reakce pomocí FAP..... | 34 |
| 4.1.4.6 | Kapilární elektroforéza | 34 |
| 4.2 | Výsledky | 36 |
| 4.2.1 | Retrospektivní molekulárně genetická analýza gliomů | 36 |
| 4.2.1.1 | Mutační analýza isocitrátdehydrogenázy 1/2 | 38 |
| 4.2.1.2 | Mutační analýza promotoru telomerázy reverzní transkriptázy | 40 |
| 4.2.1.3 | Metylační analýza promotoru O ⁶ -methylguanin-DNA-methyltransferasy 42 | |
| 4.2.1.4 | Analýza cytogenetických aberací | 44 |
| 4.2.1.5 | Reklasifikace gliomů podle WHO CNS5 2021..... | 48 |
| 5 | DISKUSE..... | 50 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 53 |

Seznam zkratek

| | |
|--------|--|
| 2-HG | R-(-)-2-hydroxyglutarát |
| A | adenin |
| A II | astrocytom, grade II |
| AA III | anaplastický astrocytom, grade III |
| AG II | gemistocytární astrocytom, grade II |
| AKT | proteinkináza B |
| ALT | alternativní prodlužování telomer (alternative lengthening of telomeres) |
| AO III | anaplastický oligodendrogliom, grade III |
| ATRX | gen ATRX (alpha-thalassemia/mental retardation X-linked) |
| C | cytosin |
| CDKN2A | inhibitor cyklin-dependentní kinasy 2A |
| CDNK2B | inhibitor cyklin-dependentní kinasy 2B |
| CIC | gen CIC (homolog <i>Drosophila capicua</i>) |
| CNS | centrální nervová soustava |
| CpG | cytosin-fosfát-guanin |
| CT | výpočetní tomografie |
| CTBRUS | Central Brain Tumor Registry of the United States |
| ddNTP | dideoxyribonukleotid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| EGF | epidermální růstový faktor |
| EGFR | receptor epidermálního růstového faktoru |
| ExoI | exonukleáza I |
| F | forward |
| FAP | FastAP termosenzitivní alkalická fosfatáza |
| FUBP1 | gen FUBP1 (far upstream element-binding protein) |
| FFPET | formalínem fixované v parafínu zalité tkáně |
| FISH | fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace |
| G | guanin |
| GBM | glioblastom |
| G-CIMP | Glioma CpG island methylator phenotype |
| H3 | histon H3 |

| | |
|-----------|--|
| HER (1-4) | humánní epidermální receptor (1 – 4) |
| IDH | isocitrátdehydrogenáza |
| iFISH | interfázní fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace |
| IHC | imunohistochemie |
| LOH | ztráta heterozygosity (loss of heterozygosity) |
| MAPK | mitogenem aktivované proteinkinázy (mitogen-activated protein kinases) |
| MGMT | O ⁶ -methylguanin-DNA-methyltransferasa |
| MLPA | metoda MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) |
| MN1 | MN1 proto-onkogen |
| MR | magnetická rezonance |
| MSP | methylačně specifická PCR |
| MYB | MYB proto-onkogen |
| MYBL1 | MYB like 1 proto-onkogen |
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid fosfát |
| NGS | sekvenování nové generace (Next-generation sequencing) |
| N-MSP | nested methylačně specifická PCR |
| NOTCH1 | gen NOTCH1 (Neurogenic locus notch homolog protein 1) |
| O II | oligodendrogliom, grade II |
| OS | celkové přežití (overall survival) |
| R | reverse |
| PCR | polymerázová řetězcová reakce |
| PI3K | fosfatidylinositol-3-kináza |
| PTEN | gen PTEN (phosphatase and tensin homolog) |
| qPCR | kvantitativní polymerázová řetězcová reakce |
| SNP | jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism) |
| STAT3 | převodník signálu a aktivátor transkripce 3 |
| T | thymin |
| TBE pufr | tris-borátový pufr |
| TERC | telomerázová RNA komponenta |
| TERT | teloméraza reverzní transkriptáza |
| WHO | Světová zdravotnická organizace (World Health Organization) |
| wt | standardní genotyp (wild type) |

1 ÚVOD

Gliomy, vysoce heterogenní skupina mozkových nádorů, tvořená gliovými buňkami, jsou nejzhoubnější a nejagresivnější formou intrakraniálních tumorů. Infiltrativně difúzní gliomy kvůli svému charakteru, znamenají v současnosti největší výzvu, co se léčby pacientů týče. Schopnost difúze do okolních tkání, znemožňuje jejich úplné odstranění a je pro ně charakteristická i vysoká rezistence vůči dosud používané terapii (Whitfield & Huse, 2022). Klíčové se zdají být právě molekulárně-genetické markery, jejichž význam stále roste.

Chápání biologie gliomů se v posledních letech rozrostlo o nové objevy a vedlo tak k aktualizaci mezinárodního standardu pro klasifikaci nádorů mozku a míchy. Klasifikace nádorů centrálního nervového systému vydaná v roce 2021 je již pátým vydáním, které shrnuje zavedené přístupy v diagnostice gliomů a nově se rozrůstá o další poznatky získané z oblasti molekulární biologie nádoru (Louis, Perry, et al., 2021).

Znalost molekulárního charakteru nádoru umožňuje nejen rozřadit tyto značně heterogenní entity do klasifikačního schématu, ale současně umožňuje nastavit cílenou léčbu vhodným pacientům a odhadnout prognózu onemocnění. V minulosti byl odhad vývoje onemocnění odvozován především z celkového výkonnostního stavu pacienta, z histopatologických rysů nádoru a ze stupně jeho malignity (Riemenschneider, Jeuken, et al., 2010). Aktuálně je prognóza pacientů hodnocena také na základě detekovaných biomarkerů. Mezi pozitivně prognosticky významné patří například mutace v genech *IDH1/2* (isocitrátdehydrogenázy 1 a 2) a naopak přítomnost mutací v promotoru genu *TERT* (telomerázy reverzní transkriptázy) poukazuje spíše na nepříznivý vývoj nemoci (Śledzińska et al., 2021). Některé molekulární změny mají i prediktivní hodnotu. Pacienti s hypermethylací promotoru genu *MGMT* (*O*⁶-methylguanin-DNA-methyltransferasy) získávají větší prospěch z léčby temozolomidem, což zásadně ovlivňuje míru jejich celkového přežití (OS) (Hegi et al., 2005). Existuje množství terapií, které cílí na konkrétní molekulární biomarkery, ale k jejich zavedení jsou třeba další preklinické a klinické studie (Yang et al., 2022).

2 CÍLE PRÁCE

1. Provést rešerši na dané téma, zorientovat se v problematice molekulárních znaků gliomů. Získat teoretické znalosti v oblasti izolací nukleových kyselin a FISH analýz. Získat praktické dovednosti v oblasti PCR metod.
2. Provést hodnocení somatických genových variant a cytogenetických změn u gliomů.
3. Identifikovat nejčastější molekulární změny u gliomů.
4. Provést stratifikaci pacientů s gliomy do rizikových skupin na základě genetických aberací.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Charakteristika gliomů

Gliomy jsou histologicky různorodou skupinou primárních nádorů centrálního nervového systému (CNS), pocházející z podpůrných buněk neuronů mozku nebo míchy. Na základě histologických podobností s normálními gliovými buňkami, jsou jednotlivé typy gliových novotvarů rozlišeny na ependymomy, astrocytomy a oligodendrogliomy (Debinski, 2021). Jedná se o relativně vzácná onemocnění, a přesto jsou gliomy představiteli nejčastějších intrakraniálních nádorů, které jsou charakterizovány vysokou mortalitou (Ostrom et al., 2014). Incidence těchto mozkových nádorů se pohybuje kolem 6,4 – 7,5/100 000 obyvatel (Fadrus et al., 2010). Vznik nádorů je zapříčiněn genetickými alteracemi určitých genů a nekontrolovatelným růstem nádorových buněk. U dospělých se často objevují v mozkových hemisférách a u dětí v mozkovém kmeni a mozečku. Příčinou agresivity těchto mozkových nádorů je schopnost migrace jejich buněk do okolí. Difúzní infiltračí se gliomy mohou šířit do okolní zdravé parenchymatické tkáně bílé hmoty mozkové, v níž je není jednoduché identifikovat (Schneider et al., 2010). Nejagresivnějším gliálním tumorem je infiltrativně rostoucí glioblastom, který tvoří přibližně 15 % všech intrakraniálních tumorů s častými recidivami (Louis, Aldape, et al., 2021). Pokud není glioblastom léčen, pohybuje se přežití kolem 3 měsíců. Současná moderní léčba posunula medián přežití pacientů s glioblastomem zhruba na 15 měsíců (Thakkar et al., 2014).

Aktuálně jsou gliomy klasifikovány podle histologických, imunochemických a molekulárně-genetických znaků, zahrnutých v novém klasifikačním systému podle Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2021 (Louis, Perry, et al., 2021). Moderní neuroonkologie již nestaví na diagnostice mozkových nádorů pouze podle jejich histologie a malignity, nyní to jsou molekulární a cytogenetické techniky, které hrají nejdůležitější roli v diagnostice, předpovědi prognózy i terapeutické účinnosti (Riemenschneider, Jeuken, et al., 2010).

3.2 Klasifikace gliomů dle WHO

Koncept klasifikace zahrnující molekulární profil gliomů se poprvé objevil ve čtvrtém vydání Klasifikace nádorů CNS podle WHO z roku 2016. Ovšem až od roku 2021 je klasifikace nádorů CNS postavena především na molekulární diagnostice. Do té doby byly nádory klasifikovány zejména podle histologických nálezů a tkáňových testů (Louis, Perry, et al., 2021).

Současně známé molekulární markery umožňují zlepšenou stratifikaci gliálních nádorů. Aktuální páté vydání klasifikace nádorů CNS (WHO CNS5 2021) díky jasným molekulárně genetickým rozdílům mezi dospělými a dětskými gliomy, rozlišuje tumory podle toho, zda postihují primárně dospělé nebo dětské pacienty (Louis, Perry, et al., 2021)

3.2.1 Klasifikace gliomů podle typu

Klasifikace WHO rozděluje nádory postihující parenchym CNS do šesti různých rodin: (1) Difúzní gliomy dospělého typu, (2) Difúzní gliomy nízkého stupně u dětí, (3) Difúzní gliomy vysokého stupně u dětí, (4) Ohraničené astrocytární gliomy, (5) Glioneuronální a neuronální nádory a (6) Ependymomy. Rodiny (1-4) odpovídají samotným gliomům (Tab. 1) a rodiny (5) a (6) nádorům vznikajícím z glie, avšak se již nejedná o gliomy (Louis, Perry, et al., 2021).

Tab. 1: Rodiny a typy gliomů dle Klasifikace nádorů centrálního nervového systému WHO z roku 2021 (převzato a upraveno dle Louis, Perry, et al., 2021).

| Rodiny | Typy |
|--|--|
| Difúzní gliomy dospělého typu | Astrocytom, <i>IDH</i> – mutant Oligodendroglioma, <i>IDH</i> – mutant, s kódelecí 1p/19q Glioblastom, <i>IDH</i> -wildtype |
| Difúzní gliomy nízkého stupně u dětí | Difúzní astrocytom, <i>MYB</i> - nebo <i>MYBL1</i> -alterovaný Angiocentrický gliom Polymorfni neuroepiteliální nádor nízkého stupně u mladistvých Difúzní gliom nízkého stupně, s alterovanou MAPK dráhou |
| Difúzní gliomy vysokého stupně u dětí | Difúzní gliom střední čáry, H3 K27-alterovaný Difúzní hemisférický gliom, H3 G34-mutovaný Difúzní gliom vysokého stupně dětského typu, H3-wildtype a <i>IDH</i> -wildtype Hemisférický gliom kojeneckého typu |
| Ohraničené astrocytární gliomy | Pilocytární astrocytom Vysoce kvalitní astrocytom s piloidními rysy Pleomorfní xanthoastrocytom Subependymální obrovskobuněčný astrocytom Chordoidní gliom Astroblastom, <i>MNI</i> -alterovaný |

IDH1/2 (isocitrátdehydrogenáza 1/2); H3 (histon H3); *MYB* (MYB proto-onkogen); *MYBL1* (MYB like 1 proto-onkogen); *MNI* (MN1 proto-onkogen); MAPK (z angl. mitogen-activated protein kinases)

3.2.2 Grading

Staré klasifikační systémy řadily nádory CNS podle různých entit a lišily se tím od klasifikačních standardů pro nádory mimo CNS. WHO se nově aktualizovaným klasifikačním systémem přibližuje způsobům klasifikace tumorů mimo CNS a zároveň zachovává již zažitě klasifikační aspekty neuroonkologické praxe (Louis, Perry, et al., 2021).

Aktuálně je grading založen na histologických vlastnostech a molekulárních markerech, jež umožňují klasifikaci do čtyř stupňů. Tyto grady se označují arabskými číslicemi od 1-4, což je změnou oproti vydání z roku 2016, kdy byly nádory CNS klasifikovány římskými číslicemi I-IV. Druhou novinkou oproti předchozím vydáním je také nahrazení termínu „entity“ za „typ“ a místo označení „varianta“ se nyní využívá „podtyp“ (Louis, Perry, et al., 2021).

Tyto složité klasifikační praktiky daly za vznik kombinovanému histologicky molekulárnímu gradingu, který k již zažitým histologickým vlastnostem nádorů přidává molekulární markery, jež mohou pomoci při určování stupně malignity (Louis, Perry, et al., 2021). Podrobněji budou dále popsány jednotlivé typy difúzních gliomů dospělého typu.

3.3 Difúzní gliomy dospělého typu

V této rodině gliálních tumorů jsou primárně zjišťovanými molekulárními parametry - stav mutace genu pro isocitrátdehydrogenázu 1/2 (*IDH1/2*), přítomnost chromozomové kódelece 1p/19q, mutace genu *ATRX* (z anglického alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked), stav methylace promotoru O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferasy (*MGMT*), homozygotní delece genu pro inhibitory cyklin-dependentní kinázy 2A/2B (*CDKN2A/B*), amplifikace genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (*EGFR*), kombinace zisku chromozomu 7 a ztráty chromozomu 10 [+7/-10] a alterace v promotorové oblasti genu telomerázové reverzní transkriptázy (*TERT*). Tyto biomarkery v současnosti poskytují relevantní informace, potřebné k co nejpřesnější diagnostice (Louis, Perry, et al., 2021; Śledzińska et al., 2022). Mezi difúzní gliomy dospělého typu, patří tři typy gliálních nádorů, jimiž jsou IDH-mutované astrocytomy, IDH-mutované oligodendrogliomy s kódelecí 1p/19q a glioblastomy, IDH-wildtype (Tab. 2) (Louis, Perry, et al., 2021). Tabulka dále zahrnuje molekulární a genetické alterace charakteristické pro jednotlivé typy.

Tab. 2: Typy difúzních gliomů dospělého typu, jejich charakteristické molekulární a genetické markery a stupně malignity dle WHO Klasifikace nádorů CNS 2021 (převzato a upraveno dle Louis, Perry, et al., 2021)

| Typy | Molekulárně-genetické alterace/markery | CNS WHO grade |
|--|--|---------------|
| Astrocytom, IDH-mutant | <i>IDH1 mut.</i> , <i>IDH2 mut.</i> , <i>ATRX</i> , <i>TP53</i> , <i>CDKN2A/B</i> | 2, 3, 4 |
| Oligodendrogliom, IDH-mutant, s kódelecí 1p/19q | <i>IDH1 mut.</i> , <i>IDH2 mut.</i> , 1p/16q del., <i>TERT</i> , <i>CIC</i> , <i>FUBP1</i> , <i>NOTCH1</i> | 2, 3 |
| Glioblastom, IDH-wildtype | <i>IDH-wt</i> , <i>TERT</i> , změny počtu chromozomů 7 a 10 [+7/-10], amplifikace genu <i>EGFR</i> | 4 |

IDH1/2 (isocitrátdehydrogenáza 1/2); *ATRX* (z anglického alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked); *CDKN2A/B* (inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A/2B); *TERT* (telomeráza reverzní transkriptáza), *CIC* (homolog *Drosophila capicua* genu); *FUBP1* (z anglického far upstream element-binding protein 1); *NOTCH1* (neurogenní lokus notch homolog protein 1); *EGFR* (receptor epidermálního růstového faktoru)

3.4 Astrocytom, IDH-mutant

Astrocytom, IDH-mutovaný, je definován jako difúzně infiltrující gliom s mutacemi v genu *IDH1*- nebo *IDH2*-, *ATRX* a *TP53*, a absencí kodelece 1p/19q (CNS WHO grade 2,3 nebo 4) (Brat et al., 2021).

3.4.1 Grading

Jak už z definice vyplývá, klasifikace dělí IDH-mutované astrocytomy na tři podtypy. Ty jsou na základě kritérií pro diagnostiku difúzních astrocytomů děleny jako CNS WHO grade 2, 3 nebo 4 (Tab. 3) (Brat et al., 2021).

Tab. 3: Kritéria klasifikace difúzního astrocytomu, IDH-mutant (převzato a upraveno dle Brat et al. 2020).

| Grade | Kritéria |
|------------------------|--|
| CNS WHO grade 2 | Difúzně infiltrativní astrocytární gliom s mutací <i>IDH1</i> nebo <i>IDH2</i> , který je dobře diferencovaný a postrádá histologické rysy. Mitotická aktivita není detekována nebo je velmi nízká. Chybí mikrovaskulární proliferace, nekróza a homozygotní delece <i>CDKN2A</i> a/nebo <i>CDKN2B</i> . |
| CNS WHO grade 3 | Difúzně infiltrativní astrocytární gliom s mutací <i>IDH1</i> nebo <i>IDH2</i> , který vykazuje fokální nebo rozptýlenou anaplazii a vykazuje významnou mitotickou aktivitu. Chybí mikrovaskulární proliferace, nekróza a homozygotní delece <i>CDKN2A</i> a/nebo <i>CDKN2B</i> . |
| CNS WHO grade 4 | Difúzně infiltrativní astrocytární gliom s mutací <i>IDH1</i> nebo <i>IDH2</i> , který vykazuje mikrovaskulární proliferaci nebo nekrózu nebo homozygotní deleci <i>CDKN2A</i> a/nebo <i>CDKN2B</i> , nebo jakoukoli kombinaci těchto znaků. |

IDH1/2 (isocitrátdehydrogenáza 1/2); *CDKN2A/B* (inhibitor cyklin-dependentní kinázy2A/2B)

3.4.2 Molekulární vlastnosti a genetický profil nádoru

3.4.2.1 Mutace v genech isocitrátdehydrogenázy 1 a 2

Mutace genů kódující enzymy isocitrátdehydrogenázy, jsou charakteristickým znakem pro IDH-mutované astrocytomy a také pro oligodendrogliomy (Brat et al., 2021). Mutace byla prvně náhodně identifikována při genomové analýze glioblastomu, ve studii Parsonse et al. v roce 2008. V této studii pozorovali, že se přítomnost mutace v genu *IDH1* vyskytuje v závislosti na věku pacienta. Mutace častěji vykazovali pacienti mladšího věku a zároveň disponovali lepším mediánem celkového přežití ve srovnání s pacienty s IDH-wildtype (Parsons et al., 2008). Tato zjištění byla následně potvrzena tentýž rok ve studii Balsse et al., která se zabývala analýzou kodonu 132 genu *IDH1* napříč různými typy mozkových nádorů (Balss et al., 2008). Watanabe et al. v návaznosti na analýzu Parsonse et al. zjistili, že mutace *IDH1* jsou rané jevy gliomogeneze, a poskytli první důkaz o tom, že tato mutace je společným znakem difuzních astrocytomů a oligodendrogliomů. Uvedli, že v naprosté většině případů zahrnutých v analýze, se u difuzních astrocytomů potvrdila přítomnost mutace v genu *IDH* i v genu *TP53*. Opakovanými analýzami biopsií od stejných pacientů nezaznamenali jediný případ, kdy by došlo k získání mutace *TP53* před mutací genu *IDH1* (Watanabe et al., 2009).

Nemutované lidské enzymy IDH, jsou NADP⁺ dependentní homodimery katalyzující dekarboxylaci isocitrátu na α -ketoglutarát za vzniku NADPH a CO₂. V eukaryotických buňkách se lidská isocitrátdehydrogenáza vyskytuje v několika izoformách. Isocitrátdehydrogenáza 1 je kódována genem *IDH1* na chromozomu 2 (2q33) a je lokalizována v cytoplazmě a peroxizomech. Homologem genu *IDH1* je gen *IDH2* na chromozomu 15 (15q26), kódující lidskou isocitrátdehydrogenázu 2, která se nachází v matrix mitochondrií. Geny *IDH1* a *IDH2* jsou sekvenčně velmi podobné, a i přes různou lokalizaci v rámci buňky, katalyzují identické reverzibilní reakce. K mutacím dochází v aktivních místech enzymu, kdy je argininový zbytek, zodpovědný za rozpoznání isocitrátu, zaměněn za aminokyselinu s nižší polaritou. To vede ke snížení afinity k isocitrátu a ke změně funkce enzymu. Nejběžnější mutací v případě *IDH1* je c.395G>A p.R132H, kdy je guanin (G) na nukleotidové pozici 396, kodonu CGT kódující arginin, zaměněn za adenin (A), čímž je smysl kodonu kódující argininový zbytek pozměněn na kodon kódující histidin (kodon CAT), nacházející se na pozici 132 aminokyselinové sekvence (R132H). Analogicky dochází k méně časté mutaci *IDH2*, kdy je arginin nejčastěji zaměněn za lysin na pozici 172 (R172K). Další mutace jsou méně frekventované (Waitkus et al., 2016). V nádorech dochází

k mutaci pouze jedné alely genu, čímž v mutované nádorové buňce vzniká katalytický heterodimer s nezměněným monomerem a monomerem nesoucím mutovaný gen *IDH* (Balss et al., 2008). Neomorfní aktivita mutované *IDH1* vede k redukci α -ketoglutarátu na 2-hydroxyglutarát (2-HG) za současné spotřeby NADPH, což způsobuje akumulaci 2-HG, jež přispívá k maligní progresi nádoru v závislosti na vyčerpání NADPH a narušení normální funkce kritických metabolických drah, které využívají aktivitu *IDH* (Dang et al., 2009; Waitkus et al., 2016).

3.4.2.2 Alterace genu *ATRX* a genu *TP53*

S mutacemi *IDH* souvisí i další molekulární alterace charakteristické pro difúzní astrocytomy dospělého typu. Mutace genu *IDH* se vyskytují v rané fázi vývoje nádoru a jsou často doprovázeny alteracemi *ATRX* a mutacemi tumor supresorového genu *TP53* (Liu et al., 2012). Gen *ATRX* je zodpovědný za remodelaci chromatinu a za zachování struktury telomer. Genetická inaktivace nebo ztráta exprese genu, je spojována s procesem zvaným alternativní prodlužování telomer (ALT). Jedná se o způsob, udržování telomer mechanismem nezávislým na přítomnosti telomerázy (Hendrych et al., 2020). Inaktivace genu *ATRX* je detekována přibližně u 70 % u astrocytomů (Marker et al., 2022).

Mutací genu *TP53*, dochází ke ztrátě funkce tumor supresorového proteinu p53, jež je zodpovědný za zprostředkování buněčné odpovědi na poškození DNA, aktivaci onkogenů, regulaci kontrolních bodů buněčného cyklu a apoptózu, což chrání buňku před tumorigenezí. Mutace je detekována u více než 90 % nádorů (Marker et al., 2022).

3.4.2.3 Alterace inhibitoru cyklin-dependentní kinázy 2A/2B

Prognosticky významná je homozygotní delece *CDKN2A* a/nebo *CDKN2B*. Jedná se o jednu z nejběžnějších genetických alterací u lidských nádorů. Ztráta exprese *CDKN2A/B* vede k dysregulaci buněčného cyklu a k proliferaci nádorové buňky. Z tohoto důvodu je přítomnost homozygotní delece *CDKN2A/B* pro pacienta s *IDH*-mutovaným astrocytmem prognosticky nepříznivá. Klasifikace nádorů CNS z roku 2021 podle WHO řadí nádory disponující delecí *CDKN2A/B*, kvůli výrazně nižšímu přežití, mezi CNS WHO grade 4 (Brat et al., 2021).

3.5 Oligodendrogliom, IDH-mutant, s kodelecí 1p/19q

Oligodendrogliom, IDH-mutantovaný, s kodelecí 1p/19q, je popisován jako difúzně infiltruující gliom s mutacemi v genu *IDH1*- nebo *IDH2*- a kodelecí ramen chromozomů 1p a 19q (CNS WHO stupeň 2 nebo 3) (Reifenberger et al., 2021).

3.5.1 Grading

IDH-mutované oligodendrogliomy jsou rozděleny podle klasifikace nádorů CNS vydané WHO v roce 2021 do dvou podtypů – IDH-mutovaný oligodendrogliom s kodelecí 1p/19q, grade 2 a IDH-mutovaný oligodendrogliom s kodelecí 1p/19q, grade 3 (Tab. 2) (Reifenberger et al., 2021).

Klasifikace oligodendrogliomů do dvou stupňů malignit si zachovala svůj prognostický význam, avšak přesná kritéria pro jejich jasné odlišení nebyla definována (Reifenberger et al., 2021). Důvodem je široké spektrum těchto gliálních tumorů, které pojímá dobře diferencované, pomalu rostoucí novotvary a rovněž rychle rostoucí malignity. Odlišit oligodendrogliom, CNS WHO grade 2 od oligodendrogliomu, CNS WHO grade 3 je možné pomocí histologických znaků, jako je vysoká celularita, rychlá mitotická aktivita, patologická mikrovaskulární proliferace nebo nekróza s/bez palisád. Pro oligodendrogliom, CNS WHO grade 3 platí, že vykazuje některou z kombinací těchto histologických nálezů. U malého procenta (<10 %) oligodendrogliomů, CNS WHO grade 3 byly na rozdíl od oligodendrogliomů, CNS WHO grade 2 nalezeny homozygotní delece *CDKN2A/B*. V případě dobře definovatelných nádorů, není vyžadováno provádět test na přítomnost homozygotní delece *CDKN2A/B*, ale může být vhodným indikátorem oligodendrogliomu, CNS WHO grade 3, pokud by nález nebyl jednoznačně identifikovatelný (Reifenberger et al., 2021).

3.5.2 Molekulární vlastnosti a genetický profil nádoru

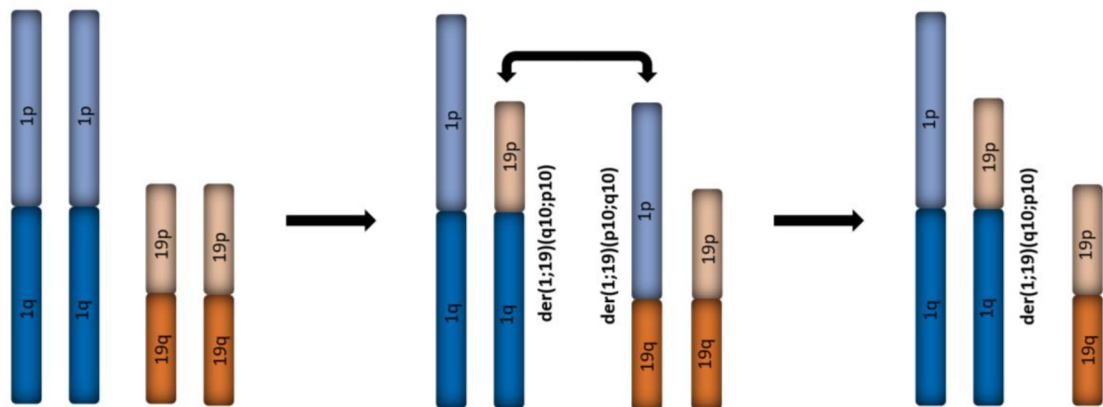
3.5.2.1 Mutace v genech isocitrátdehydrogenázy 1 a 2

Mutace genu *IDH1/2* je stejně jako u astrocytomy jedním z kritérií pro diagnostiku oligodendrogliomu (viz výše, kapitola 3.4.2.1). I u oligodendrogliomů je převládající změnou v aminokyselinové sekvenci záměna argininu za histidin (R132H) způsobená mutací genu *IDH1*. IDH-mutované oligodendrogliomy ve srovnání s IDH-mutovanými astrocytomy mají větší incidenci výskytu mutací *IDH2* (Hartmann et al., 2009).

3.5.2.2 Chromozomová kodelece 1p/19q

Patognomickým biomarkerem definující oligodendrogliomy, je kompletní delecce krátkého ramena chromozomu 1 (1p) a zároveň dlouhého ramena chromozomu 19 (19q) (Griffin et al., 2006). K současné ztrátě chromozomových ramen dochází pravděpodobně vytvořením dvou odvozených chromozomů: $der(1;19)(p10;q10)$ a $der(1;19)(q10;p10)$, pomocí reciproční výměny celých ramen chromozomů, s následnou ztrátou jednoho z derivátů nesoucí krátké rameno chromozomu 1 a dlouhé rameno chromozomu 19 - $der(1;19)(p10;q10)$ (Obr. 1). Alternativou je delecce krátkého ramene chromozomu 1 u jedné z kopií chromozomu a delecce dlouhého ramene chromozomu 19 a následné spojení zbývajících ramen v $der(1;19)(q10;p10)$. U jiných nádorů není podobná chromozomová kodelece ramen dvou nehomologních chromozomů známa (Griffin et al., 2006).

V případě, že nedojde ke kodeleci a je detekována delecce pouze jednoho z chromozomových ramen, není diagnóza spojována s oligodendrogliomy. Tyto nekompletní nebo částečné delecce vedou k diagnóze glioblastomu, IDH-wildtype (Reifenberger et al., 2021).



Obr. 1: Mechanismus chromozomové kodelece ramen 1p/19q u Oligodendrogliomu, IDH-mutant s kodeleci 1p/19q (převzato a upraveno dle Griffin et al., 2006)

3.5.2.3 Mutace promotoru telomerázové reverzní transkriptázy

Jedním ze znaků nádorových buněk je schopnost jejich neomezené replikace. Normální somatické buňky jsou omezeny délkou telomer, které se s každým replikačním cyklem zkracují. Aktivací telomerázy se nádorové buňky vyhýbají stárnutí a zachovávají si svůj neomezený replikační potenciál. Telomeráza je ribonukleoprotein skládající se ze dvou podjednotek. První podjednotkou je telomerázová RNA komponenta (TERC) a druhou katalytickou podjednotku enzymu tvoří telomerázová reverzní transkriptáza (TERT) (Arita et al., 2013).

U velké většiny IDH-mutovaných oligodendroglálních nádorů s kodeleci 1p/19q jsou pozorovány hotspot mutace C228T a C250T v promotoru genu *TERT* (Reifenberger et al., 2021). Podstatou nejčastějších somatických mutací genu *TERT* v CNS, je záměna cytosinu za thymin (C > T) v pozici g.1 295 228 (varianta C228T) nebo g.1 295 250 (varianta C250T). Obě mutace promotoru *TERT* se nachází proti směru exprese od start kodonu ATG. Mutace C228T 146 bp protisměrně od ATG a mutace C250T 124 bp od start kodonu. C228T a C250T tvoří shodný nukleotidový úsek o jedenácti párech bází (5'-CCCCTTCCGGG-3'), jehož součástí je vazebné místo (5'-TTCC-3') transkripčních faktorů E-26 (ETS) (Reitman et al., 2013), které zvyšují transkripční upregulaci exprese promotoru *TERT*, což vede ke stabilizaci telomer, immortalizaci buněk a buněčné proliferaci (Reifenberger et al., 2021). Výskyt C228T a C250T se vzájemně vylučuje z důvodu nadbytečného účinku mutace (Arita et al., 2013).

Pozorováním vztahu mezi mutacemi promotorové oblasti genu *TERT* a dalšími mutacemi, které se vyskytují u dospělých gliálních tumorů, byla zjištěna asociace s kodeleci chromozomových ramen 1p/19q, která souvisí právě s oligodendrogliomy. U nádorů bez ztráty 1p/19q s mutací genu *IDH* se přítomnost mutace promotoru *TERT* a *IDH* většinou vzájemně vylučují. Mutace promotoru *TERT* úzce souvisí i s nádory IDH-wildtype bez kodelece 1p/19q, což je rysem glioblastomů. Procentuálně je frekvence výskytu mutace nejvyšší u oligodendrogliomů (75 – 100 %), velmi vysoká u glioblastomů (50 – 89 %) a nízká u astrocytomů (kolem 0 – 33 %) (Arita et al., 2013).

3.6 Glioblastom, IDH-wildtype

Glioblastom, IDH-wildtype, je difúzní, astrocytární gliom, který se vyznačuje standardním genotypem isocitrátdehydrogenázy (IDH-wildtype) a histonu 3 (*H3*), a má jeden či více z následujících histologických nebo genetických znaků: mikrovaskulární proliferace, nekróza, mutace promotoru *TERT*, amplifikace genu *EGFR* nebo změny v počtu kopií chromozomů +7/-10 (CNS WHO stupeň 4) (Louis, Aldape, et al., 2021).

3.6.1 Grading

Glioblastomu, IDH-wildtype je podle Klasifikace nádorů centrálního nervového systému dle WHO z roku 2021 přiřazen nevyšší stupeň malignity CNS WHO grade 4. Na základě histologie glioblastomu jsou popsány tři subtypy – obrovskobuněčný glioblastom, gliosarkom a epiteloidní glioblastom (Louis, Aldape, et al., 2021).

3.6.2 Molekulární vlastnosti a genetický profil nádoru

3.6.2.1 Mutace v genech isocitrátdehydrogenázy 1 a 2

Dříve než došlo k aktualizaci klasifikace nádorů CNS, byly glioblastomy rozlišovány jako „primární“ (IDH-wildtype) a „sekundární“ (IDH-mutované). Nyní se však jedná o zastaralá označení a jejich používání není doporučeno. Pojem „primární glioblastom“ definuje nynější glioblastom, IDH-wildtype, kdežto „sekundární glioblastom“ byl v nejnovějším vydání klasifikace nahrazen za IDH-mutovaný astrocytom, WHO grade 4 (Melhem et al., 2022). Mutace genu *IDH*, jakožto časná událost ve vývoji tumoru, byla jedním z molekulárních markerů využívaných pro odlišení primárního glioblastomu od progresivního sekundárního glioblastomu (Eskilsson et al., 2018).

Nádory s mutovaným genem *IDH1*, jak již bylo zmíněno v kapitole 3.4.2.1 zabývající se IDH-mutovanými astrocytomy, mají snížené hladiny NADPH. Nízké hladiny NADPH mohou být důvodem zvýšené citlivosti na ozařování a chemoterapeutika u IDH-mutovaných nádorů (Bleeker et al., 2010). Glioblastomy však mutace v genech *IDH* nevykazují, proto se přežití pacientů s glioblastom pohybuje pouze řádech měsíců (Thakkar et al., 2014).

3.6.2.2 Mutace promotoru telomerázové reverzní transkriptázy

Jak bylo zmíněno výše v kapitole 3.5.2.3 zabývající se IDH-mutovanými oligodendrogliomy s kodelecí 1p/19q, mutace promotoru *TERT* způsobují stabilizaci telomer a zodpovídají tak za imortalizaci nádorových buněk. Mutace promotoru jsou jedním z kritérií pro diagnostiku glioblastomu, IDH-wildtype a prevalence jejich výskytu se pohybuje rozmezí 50 – 89 % (Arita et al., 2013). Jde tak o nejčastější molekulární změnu u glioblastomů, která je spojována s jejich agresivnějším charakterem (Louis, Aldape, et al., 2021).

3.6.2.3 Numerické alterace chromozomu 7 a 10

Molekulárním markerem charakterizujícím IDH-wildtype glioblastomy je přítomnost kombinovaného zisku chromozomu 7 se současnou ztrátou chromozomu 10, který je souhrnně označován jako +7/-10. Zisk/ztráta celých chromozomů je nejčastější variantou alterací chromozomů 7 a 10. Buňky v tomto případě obsahují tři a více kopií chromozomu 7 (polyzomie 7) a pouze jednu kopii chromozomu 10 (monozomie 10). Ovšem běžně dochází také k zisku/deleci jednotlivých chromozomových ramen. Varianty 7+/10q- a 7q+/10- jsou spolu s 7+/10- spojovány se špatným přežitím pacientů (Stichel et al., 2018).

3.6.2.4 Alterace v genu pro fosfatázu a homolog tenzinu

Tumor supresorový gen *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog) lokalizovaný na chromozomu 10 (lokus 10q23.3), nese název podle svého proteinového produktu, jehož domény vykazují sekvenční homologii s tyrosinfosfatázou a tenzinem (Álvarez-Garcia et al., 2019). Negativně reguluje signální kaskádu PI3K/AKT, která souvisí s buněčným růstem, přežitím, proliferací a migrací buněk. Porušení regulace této dráhy vede k malignímu růstu (Chow & Baker, 2006). Jde o jednu z nejčastějších genetických změn u glioblastomů, při které dochází k oblastním nebo celkovým delecím chromozomu 10 (80 – 90%). Nejen ztráta heterozygoty (LOH) přispívá k procesu tumorigeneze glioblastomu, ale i mutace genu *PTEN* (20 – 40%) jsou zodpovědné za jeho progresi (Hill et al., 2003).

3.6.2.5 Alterace genu pro receptor epidermálního růstového faktoru

Neméně významnou genetickou událostí ve vývoji glioblastomu jsou změny v transmembránovém receptoru tyrozinkinázového epidermálního růstového faktoru (EGFR), známého také jako humánní epidermální receptor (HER1) nebo ErbB-1, který spadá do ErbB rodiny receptorových tyrosinkináz spolu s ErbB-2-4 (HER2-4). Struktura této rodiny receptorů EGFR je stejná. Receptory jsou složeny z extracelulární domény, jejímž

úkolem je vázat příslušný ligand z rodiny epidermálních růstových faktorů (EGF), dále z hydrofobní domény procházející buněčnou membránou a z tyrozinkinázové domény lokalizované v cytoplazmě, která zodpovídá za tyrosinkinázovou aktivitu receptorů (An et al., 2018; Normanno et al., 2006). Navázáním EGF na receptor jsou spuštěny přísně regulované signální dráhy, jejichž součástí jsou proteiny regulující fyziologické a patologické procesy. Ve většině případů se jedná o dráhy STAT3, MAPK a také AKT, které spolu s efektorovými molekulami tvoří integrovaný systém zodpovědný za proliferaci, přežití a metabolismus buněk (Lopez-Gines et al., 2010; Mizoguchi et al., 2006).

Alterace receptoru epidermálního růstového faktoru, nejsou výhradní specifikou glioblastomů (Hatanpaa et al., 2010), ale objevují se i u karcinomů plic, tlustého střeva nebo prsu (Normanno et al., 2006). Gen *EGFR* je umístěn na krátkém ramenu chromozomu 7 (lokus 7p11.2). Typické pro glioblastomy jsou amplifikace tohoto genu, avšak často dochází i k jeho mutacím, genovým přeskupením nebo změnám v sestřihu (Eskilsson et al., 2018). Nejfrekventovanější mutací je EGFRvIII, která se v nádorových buňkách vyskytuje výhradně spolu s amplifikacemi genu *EGFR* (Eskilsson et al., 2016). V důsledku delece 267 aminokyselin, postrádá EGFRvIII doménu vázající ligand. Tato mutace způsobí, že je mutanta EGFRvIII schopna konstitutivní autofosforylace, jež umožňuje spontánně fosforylovat tyrosinové zbytky v intracelulární doméně (An et al., 2018). Eskilsson et al. pozorovali, že k amplifikacím *EGFR* dochází ve všech částech nádoru, kdežto mutace EGFRvIII byly nalezeny jen v určitých místech. Tato intratumorální heterogenita poukazuje na to, že amplifikace genu *EGFR* jsou časnou událostí gliomogeneze a k mutacím dochází až v pozdějších fázích (Eskilsson et al., 2016).

Amplifikace *EGFR* se objevuje přibližně u 40 % glioblastomů, IDH-wildtype (Louis, Aldape, et al., 2021) a ve většině případů je spojována s nadměrnou expresí proteinu EGFR (Hatanpaa et al., 2010). Typickým procesem amplifikace u mozkových nádorů je zmnožení genu pomocí extrachromozomálních elementů zvaných jako „double minutes“ chromozomy (Vogt et al., 2004). V důsledku heterogenity glioblastomu, mohou různé oblasti nádoru vykazovat odlišný podíl buněk s amplifikací *EGFR* a bez ní. Mohou se vyskytnout oblasti s 10 % a zároveň i s 60 % zastoupením buněk s amplifikací *EGFR* v rámci stejného nádoru (Hatanpaa et al., 2010). Okada et al. uvedli, že amplifikace *EGFR* může souviset s invazivností nádoru. Pozorovali, že infiltrativní okraje, obsahují buňky s vysokým stupněm amplifikace na rozdíl od centra tumoru (Okada et al., 2003).

3.7 Epigenetické markery

3.7.1 Metylace promotoru genu O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferasy

Metylace promotoru O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferasy (*MGMT*) není specifickým markerem pro konkrétní typ difúzních gliomů, přesto je jeho detekce významná z hlediska predikce odpovědi na alkylační činidla (Komori, 2022). Gen *MGMT* kóduje opravný protein zodpovídající za odstranění promutagenní metylové skupiny z O-6-methylguaninu v DNA., který má schopnost zamezit vzniku genové mutace a následné tumorigenezi (Brat et al., 2021). Metylace promotoru způsobuje snížení aktivity enzymu *MGMT*, což umožňuje alkylačním činidlům poškodit nádorovou DNA a indukuje tak přechod buňky do apoptózy. Nejběžnějším používaným alkylačním chemoterapeutikem je temozolomid (Riemenschneider, Hegi, et al., 2010). Metylace promotoru *MGMT* je prognosticky významný markerem zejména u glioblastomu, IDH-wildtype, který často disponuje ztrátou chromozomu 10, na jehož lokusu (10q26) je lokalizován i gen *MGMT*. Tímto mechanismem je gen *MGMT* inaktivován (Brat et al., 2021). Ve studii Molenaar et al., bylo popsáno, že gliomy disponující současně mutací genu *IDH1* a metylací promotoru genu *MGMT*, mají výrazně lepší přežití, než pacienti bez těchto mutací (Molenaar et al., 2014).

Gliomy se somatickými mutacemi genu *IDH* jsou úzce spojeny s cytosin-fosfát-guaninovým (CpG) ostrovním metylátorovým fenotypem (G-CIMP z anglického Glioma CpG island methylator phenotype), jež je charakterizován hypermetylací v celém nádorovém genomu. Hypermetylace promotoru vede k umlčování tumor supresorových genů a k maligní transformaci buňky. Pacienti s IDH-mutovanými/G-CIMP-pozitivními nádory, vykazují lepší prognózu než pacienti, jejichž nádory G-CIMP nenesou (Malta et al., 2018). V závislosti na zvyšování metylace CpG ostrůvků v genomu IDH-mutovaných buněk, je současně s mutacemi genů *IDH1/2* asociována metylace promotorové oblasti genu *MGMT* (Horbinski et al., 2021).

3.8 Molekulární a genetická diagnostika gliomů

Molekulární a genetické diagnostice gliomů předchází vyšetření pomocí zobrazovacích neuroradiologických metod v podobě výpočetní tomografie (CT) nebo magnetické rezonance (MR), které slouží k lokalizaci, zjištění rozsahu a popřípadě k identifikaci typu mozkového nádoru (Fadrus et al., 2010). Po odběru nádorové tkáně dochází k vyšetření molekulárně-genetických znaků nádoru, které jsou součástí komplexní diagnostiky, kam spolu s nimi spadá i histopatologické a imunohistochemické (IHC) vyšetření (Smrčka et

al., 2016). Cytogenetické vyšetření chromozomových aberací je obvykle prováděno z parafinových bloků nebo otiskových preparátů pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Ze vzorků nukleových kyselin izolovaných z nádorové tkáně, lze provádět vyšetření na molekulární úrovni, kam spadají metody založené na polymerázové řetězcové reakci (PCR), Sangerovo sekvenování, SNaPshot assay, sekvenování nové generace (NGS z anglického Next generation sequencing), MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) a další (Bieńkowski et al., 2018; Śledzińska et al., 2022; Urbanovska et al., 2019).

3.8.1 Polymerázová řetězcová reakce (PCR) včetně metylačně specifické PCR

Nejpoužívanější metodou využívající metodiku PCR je kvantitativní polymerázová řetězcová reakce (qPCR), umožňující v průběhu každého cyklu nepřetržitě zaznamenávat množství PCR produktů. Přítomnost fluorescenčního substrátu umožňuje po jeho navázání na DNA detekovat její množství. Jedná se o jednu z nejspolehlivějších metod pro studium exprese cílových genů. Disponuje vysokou citlivostí a sekvenační specifitou (Ginzinger, 2002). Metody PCR lze využít pro vyšetření mutací genů *IDH1/2*, *TERT* nebo pro zjištění metylačního statusu promotoru genu *MGMT* (Herman et al., 1996; Śledzińska et al., 2022).

První, kdo popsal metodu založenou na metylačně specifické polymerázové řetězcové reakci (MSP) byl Herman et al. v roce 1996 (Herman et al., 1996). Metoda slouží k analýze stavu metylace CpG dinukleotidů v CpG ostrůvcích a je proto vhodná pro rozpoznání stavu metylace promotoru genu *MGMT*. Základem této metody je ošetření bisulfitem, který chemicky modifikuje nemetylované cytosiny (C) na jednovláknové DNA a konvertuje je na uracil (U). Metylované cytosiny však zůstávají beze změny. Následuje amplifikace za použití primerů specifických pro metylovanou a nemetylovanou DNA a výsledkem jsou amplikony vizualizované pomocí gelové elektroforézy (Herman et al., 1996).

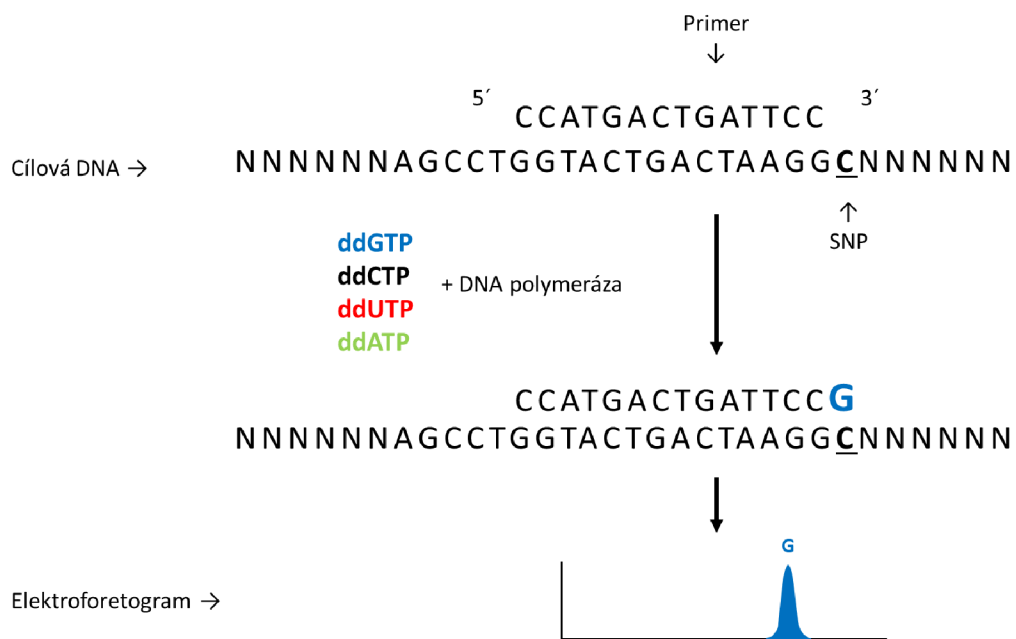
V průběhu let se vyvíjely různé alternativy MSP a jednou z nich je nested metylačně specifická PCR (N-MSP). N-MSP je metoda skládající se ze dvou kol PCR, přičemž první kolo PCR je založené na amplifikaci DNA modifikované bisulfitační reakcí pomocí primerů nerozlišujících metylační stav. Druhé kolo je tradiční MSP za použití primerů specifických pro metylovanou a nemetylovanou alelu. Využití detekce pomocí N-MSP je vhodné zejména pokud je vzorek nekvalitní nebo pokud obsahuje malé množství DNA (Derks et al., 2004).

3.8.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Standardním molekulárně cytogenetickým vyšetřením využívaným v klinické praxi k identifikaci genetických biomarkerů, je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Jde o dobře známou metodu umožňující pracovat s biologickým materiálem fixovaným v parafinových bločcích, díky čemuž zůstává morfologická informace nezměněna. Avšak při krájení parafinových bloků může dojít k odkrojení části jader, což je jejich značnou nevýhodou. Tento problém řeší otiskové preparáty z nativní tkáně, které umožňují zachovat jádro v celém jeho objemu. Vyšetření se provádí nejčastěji na interfázních jádrech, od čehož se odvíjí název interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (iFISH). Pomocí této metody, využívající dvoubarevných sond, se u gliálních nádorů sledují především delece tumor supresorových genů *PTEN* a *CDKN2A/B*, dále amplifikace onkogenu *EGFR* a změny počtu chromozomů 7, 9 a 10. Déle se iFISH využívá k detekci kodelece 1p/19q (Horbinski et al., 2011; Korshunov et al., 2005).

3.8.3 SNaPshot assay

Metoda SNaPshot je využívána pro analýzu jednonukleotidových polymorfismů, označovaných jako SNPs (z anglického single-nucleotide polymorphisms). Výhodou této metody je možnost vyšetřit až 10 různých SNP v jedné reakci, nezávisle na jejich umístění v genomu. Podstatou jsou přesně definované primery vážící se na dobře známé komplementární templátové sekvence v těsné blízkosti SNP. V přítomnosti DNA polymerázy a fluorescenčně značených dideoxyribonukleotidů (ddNTP) je navázaný primer na svém 3'konci prodloužen o jeden ddNTP v závislosti na komplementaritě se SNP na templátovém vlákně. Detekce jednotlivých polymorfismů je provedena v rámci kapilární elektroforézy, jejímž výsledkem je elektroforetogram sestávající z různě barevných píků v závislosti na typu přidaného fluorescenčně značeného ddNTP (*Features of the SNaPshot*® *Multiplex System*, n.d.). Testování pomocí SNaPshot assay lze využít například k detekci mutací v genech *IDH* nebo *TERT* (Urbanovska et al., 2019; Weyerer et al., 2021). Mechanismus reakce je stručně znázorněn na Obrázku 2.



Obr. 2: Schéma znázorňující náležitosti metody SNaPshot assay pro genotypizaci SNP (převzato a upraveno dle Features of the SNaPshot® Multiplex System, n.d.)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Analýza mutace promotoru *TERT*

Pro analýzu mutací promotoru genu *TERT* bylo retrospektivně zpracováno 74 patientských vzorků získaných v rozmezí let 2018 – 2019 společností EUC Laboratoře CGB, a.s., Ostrava. Všem pacientům byl diagnostikován gliom, jehož typ a stupeň malignity byl hodnocen podle Klasifikace nádorů centrálního nervového systému z roku 2016 vydané WHO. Všichni pacienti byli starší 18 let a u každého vzorku byla provedena molekulární i cytogenetická analýza. Vyšetření mutačního stavu promotoru genu *TERT* bylo provedeno pomocí metody SNaPshot assay.

4.1.1 Biologický materiál

Biologickým materiálem využívaným k detekci mutací promotoru genu *TERT* byla nádorová DNA. Izolace byla provedena pomocí sady cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostic, Německo), která umožnila izolovat nádorovou DNA ze vzorků fixovaných formalínem a zalitých v parafínu (FFPET). Zatímco u vzorků nativní tkáně byla purifikace provedena pomocí MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostic, Německo). Oba postupy byly provedeny podle protokolu výrobce.

4.1.2 Chemikálie

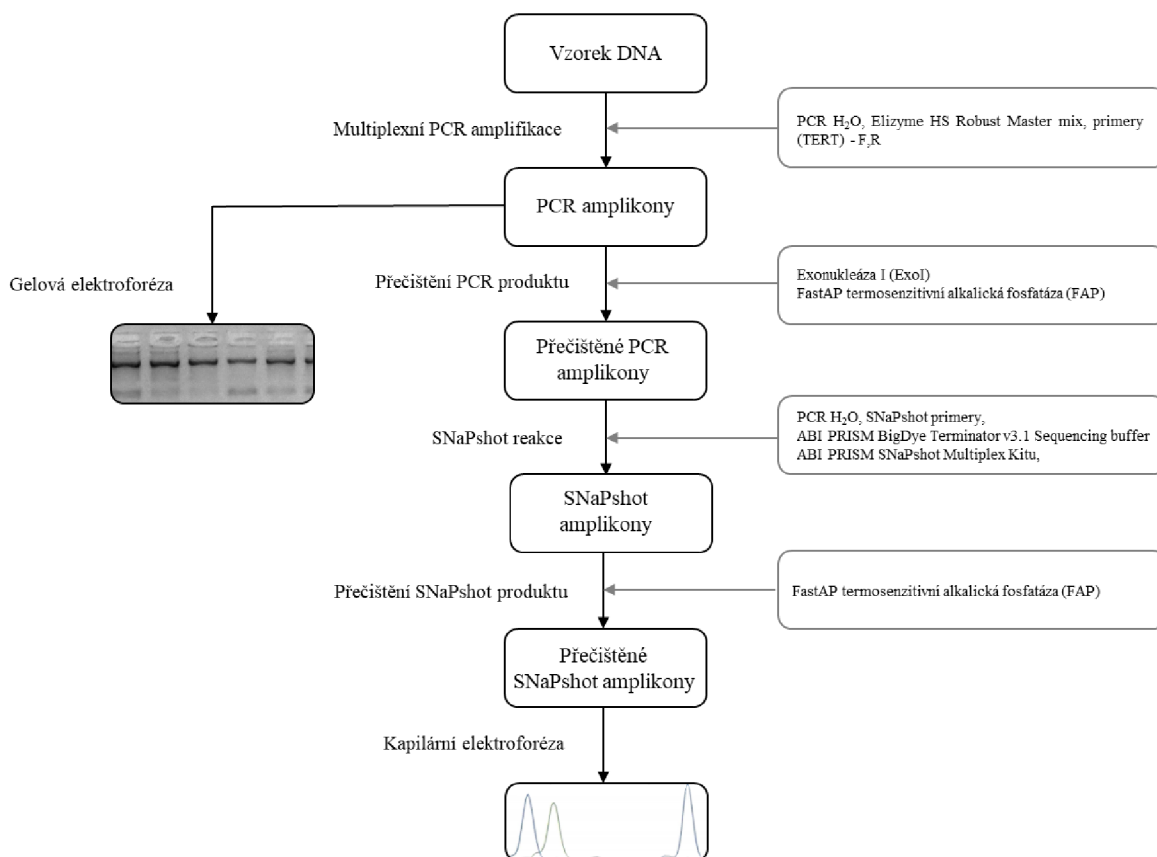
- PCR H₂O (Top Bio, Česká republika)
- EliZyme HS Robust Master mix (Elisabeth Pharmacon s.r.o, Česká republika)
- Primery (*TERT*) – F, R (20 pmol/μl) (IDT, Belgie)
- ExoI (20U/μl) (Thermo Fisher Scientific, Litva)
- FAP (1U/μl) (Thermo Fisher Scientific, Litva)
- ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Sequencing buffer (5x) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Life Technologies, UK)
- SNaP primery C228T a C250T (IDT, Belgie)
- Hi-Di formamid (Life Technologies, UK)
- GeneScan™ 120 LIZ™ (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Agaróza (LONZA, UK)
- GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

- Orange G nanášecí pufr (Thermo Fister Scientific, Litva)
- Etidium bromid (Thermo Fisher Scientific, Litva)

4.1.3 Přístrojové vybavení

- Microtube centrifuge (HWLAB, Čína)
- Laminární box (Telstar Industrials, S.L., Španělsko)
- Vortex (IKA, Německo)
- Termocykléry Applied Biosystem Proflex PCR Systém (Life Technologies, Singapur)
- Bioer cycler (Bioer, Čína)
- Kapilární elektroforéza ABI3130 (Applied Biosystems, USA)
- Elektroforetická vana Scie-Plas (Scie-Plas Ltd., UK)
- Zdroj pro elektroforézu (CONSORT, Belgie)
- Fotoaparát Olympus XZ-1 (Olympus, Japonsko)
- Dokumentační systém KODAK EDAS 290LE (Eastman Kodak Co., Rochester, NY)
- GeneMapper™ Software 5

4.1.4 Metody



Obr. 3: Pracovní postup pro analýzu mutačního statusu promotoru genu *TERT* metodou SNaPshot assay.

4.1.4.1 PCR pro test SNaPshot

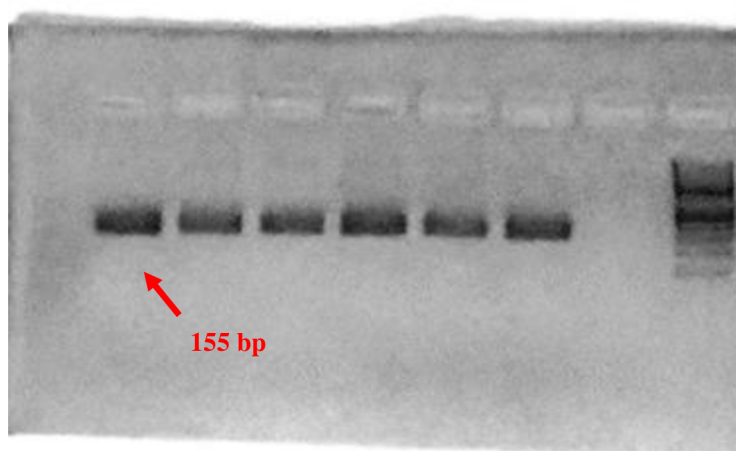
Prvním krokem pro zjištění stavu mutace v promotoru genu *TERT* metodou SNaPshot, byla amplifikace DNA patientských vzorků pomocí metody PCR. Nejprve byly rozmrazeny a pomocí vortexu a centrifugy promíchány všechny příslušné reagentie a DNA. Do zkumavky o objemu 2 ml byla připravena reakční směs (MasterMix) smícháním 10,5 μ l PCR H₂O, 12,5 μ l Elizyme HS Robust Master mix a 0,5 μ l forward (F) a 0,5 μ l reverse (R) primeru (*TERT*) o koncentraci 20 pmol/ μ l. Uvedená množství odpovídají jednomu vzorku. Vzniklý MasterMix byl promíchán na vortexu a krátce centrifugován. Do zkumavek o objemu 0,2 ml bylo přidáno po 24 μ l vytvořeného MasterMixu a 1 μ l patientské DNA. Zkumavky byly po celou dobu umístěny v chladícím stojánku. Do jedné ze zkumavek byla místo DNA přidána beztemplátová kontrola (PCR voda). Připravené zkumavky byly krátce stočeny na centrifuze a poté byly vloženy do termocykléru, kde byl spuštěn příslušný program zahajující proces PCR (Tab. 4).

Tab. 4: Přesný průběh PCR reakce pro amplifikaci genu *TERT*.

| Krok | Teplota | Čas | Cyklus |
|-----------------|---------|-----------|--------|
| Aktivace | 95 °C | 5 min | 1 |
| Denaturace | 95 °C | 30 s | |
| Hybridizace | 60 °C | 30 s | 35 |
| Syntetická fáze | 72 °C | 30 s | |
| Finální syntéza | 72 °C | 5 min | 1 |
| Chladnutí | 4 °C | neomezeně | - |

4.1.4.2 Elektroforéza PCR produktu

Rozpuštěním 3 g agarózy ve 100 ml 0,5x TBE pufru, byl připraven 3% agarózový gel, do kterého bylo přidáno 5,5 μ l etidium bromidu. Do jednotlivých jamek mikrotitrační desky bylo z každého vzorku odebráno a přeneseno 5 μ l PCR produktu. Ke každému vzorku v mikrotitrační desce byly následně přidány 3 μ l nanášecího pufru orange G a vzniklý roztok v jamkách byl pipetou promísen. Takto připravené vzorky byly zleva nanášeny do jamek 3% agarózového gelu ponořeného v 0,5x TBE pufru. Do krajní jamky byl přidán standard molekulové hmotnosti GeneRuler 50bp DNA Ladder. Následovala elektroforetická separace probíhající po dobu 30 minut při napětí 110 V. Po skončení elektroforézy byl gel zobrazen pomocí dokumentačního systému KODAK EDAS 290LE a byla pořízena fotografie gelu fotoaparátem Olympus XZ-1 (Obr. 4). Elektroforéza sloužila ke kontrole délky a čistoty získaného PCR produktu.



Obr. 4: Fotografická dokumentace 3% agarózového gelu. Vzorky s amplifikovanou DNA (zleva) v jamkách 1-6, jamka 7 beztemplátová (negativní) kontrola a v jamce 8 standard molekulové hmotnosti GeneRuler 50bp DNA Ladder. Výsledek získán dokumentačním systémem KODAK EDAS 290LE; fotografie zhotovena fotoaparátem Olympus XZ-1.

4.1.4.3 Přečištění PCR produktu

Před zahájením přečištění, které slouží k odstranění neinkorporovaných primerů a degradaci nenavázaných nukleotidů, byl nejprve obsah zkumavek s PCR produktem proklepán a krátce stočen na centrifuze. Do chladicí desky byly připraveny enzymy Exonukleáza I (ExoI) o koncentraci 20U/μl a FastAP termosenzitivní alkalická fosfatáza (FAP) o koncentraci 1U/μl. Pro přečištění PCR produktu byly připraveny nové sterilní mikrozkušavky o objemu 0,2 ml. Do každé mikrozkušavky bylo pipetou nanášeno 0,5 μl ExoI, 1 μl FAP a 5 μl PCR produktu. Obsah zkumavek byl pomocí pipety promísen, následně stočen na centrifuze a jednotlivé zkumavky byly přeneseny do cykléru, kde byl spuštěn příslušný program. Reakce probíhala 30 minut ve dvou 15minutových cyklech (Tab. 5). Po celou dobu probíhající reakce bylo vypnuté nahřívání víka cykléru.

Tab. 5: Podmínky přečištění PCR produktu pomocí Exonukleázy I a FastAP termosenzitivní alkalické fosfatázy.

| Cyklus | Teplota | Čas |
|--------|---------|--------|
| 1. | 37 °C | 15 min |
| 2. | 85 °C | 15 min |

4.1.4.4 SNaPshot reakce

Po přečištění PCR produktů následovala samotná SNaPshot reakce za použití sady Applied Biosystems® SNaPshot Multiplex Kit od společnosti Life Technologies (UK). Všechny používané reagenty byly po rozmražení promíchány na vortexu a krátce stočeny na centrifuze. Prvním krokem byla příprava směsi primerů C228T a C250T o koncentraci 10 pmol/μl v poměru 1:1 do jedné ze mikrozkušavek. Pro jeden vzorek byl celkový objem směsi SNaP primerů v mikrozkušavce 2 μl. Následovala příprava reakční směsi (MasterMixu) do zkumavky o objemu 2 ml. Do mikrozkušavky bylo přeneseno 3,5 μl PCR H₂O, 0,5 μl 5x ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Sequencing bufferu, 2 μl ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kitu a 2 μl vytvořené směsi SNaP primerů. Směs byla řádně promísená pomocí pipety. Všechna uvedená množství pro přípravu MasterMixu odpovídají přípravě jednoho vzorku. Takto připravený MasterMix byl po 8 μl pomocí pipety rozplněn do nových sterilních mikrozkušavek o objemu 0,2 ml. Následně byly pipetou do jednotlivých mikrozkušavek přidány 2 μl přečištěných PCR produktů a vzniklý obsah byl pomocí pipety

promísen. Takto připravené mikrozkušavky byly vloženy do termocykléru, kde byl spuštěn příslušný program (Tab. 6).

Tab. 6: Podmínky SNaPshot reakce.

| Krok | Teplota | Čas | Cyklus |
|-------------|---------|-----------|--------|
| Denaturace | 96 °C | 10 s | 30 |
| Hybridizace | 60 °C | 35 s | |
| Chladnutí | 4 °C | neomezeně | - |

4.1.4.5 Přečištění SNaPshot reakce pomocí FAP

Produkt získaný SNaPshot reakcí bylo třeba přečistit od nenavázaných primerů. K tomuto účelu byla použita FastAP termosenzitivní alkalická fosfatáza (FAP) o koncentraci 1U/μl. Zkušavky se SNaPshot produktem i FAP byly krátce stočeny na centrifuze. K 10 μl získaného produktu SNaPshot reakce byl přidán 1 μl FAP a celkový obsah mikrozkušavek byl promísen pipetou a následně stočen na centrifuze. Takto připravený vzorek byl vložen do cykléru s vypnutým nahříváním víka a byl spuštěn příslušný program. Délka programu byla 30 minut a skládala se ze dvou po sobě následujících cyklů (Tab. 7).

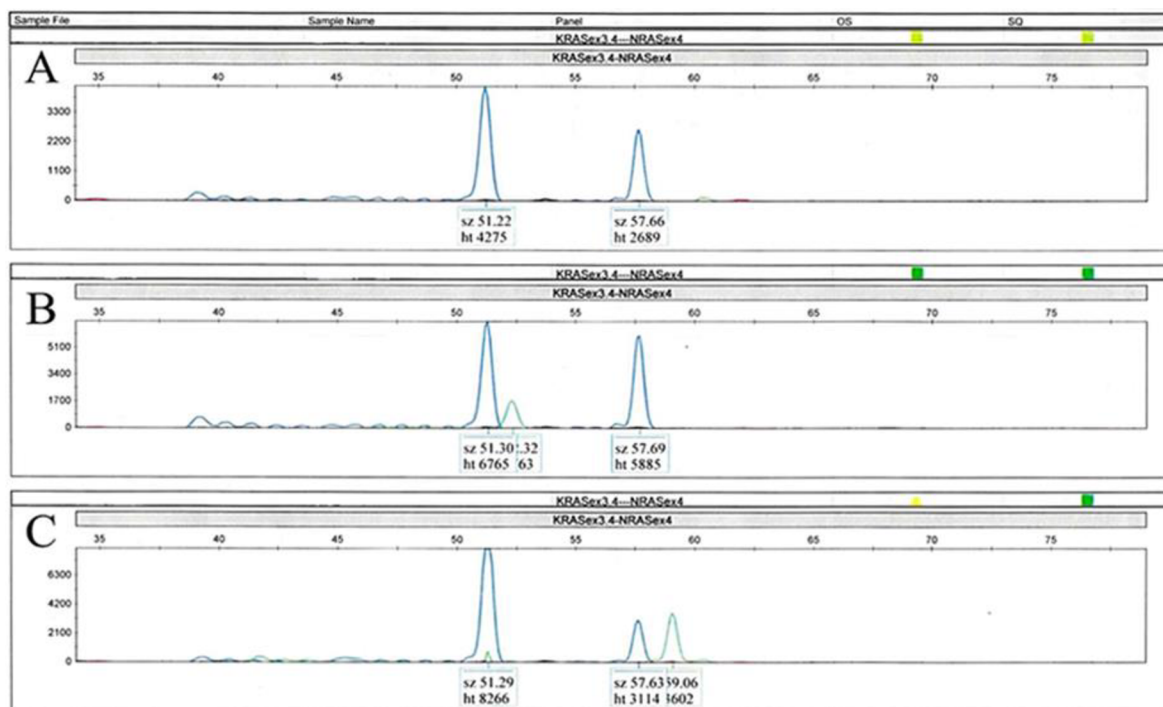
Tab. 7. Podmínky programu přečištění SNaPshot produktu.

| Cyklus | Teplota | Čas |
|--------|---------|--------|
| 1. | 37 °C | 15 min |
| 2. | 85 °C | 15 min |

4.1.4.6 Kapilární elektroforéza

Po přečištění SNaPshot produktu následovala vizualizace variant v promotoru genu *TERT* pomocí kapilární elektroforézy. Do 96-jamkové desky bylo přeneseno 9 μl Hi-Di formamidu a 0,25 μl GS120LIZ Size ladderu do každé jamky podle počtu vzorků. Následně byl do jamek přidán 1 μl příslušného přečištěného produktu SNaPshot reakce. Jamky, které neobsahovaly vzorek byly naplněny 10 μl Hi-Di formamidu. Takto připravená deska byla zakryta pomocí septa a následně krátce centrifugována. Po ověření, že se v každé jamce nachází vzorek, byla provedena denaturace v termocykléru při 95 °C probíhající po dobu 5

minut. Poté byla deska umístěna do přístroje ABI3130 (Applied Biosystems, USA) ve kterém následovala separace, produktů SNaPshot reakce. Doba nástřiku byla 16 sekund a doba chodu 450 sekund. Získaná data byla analyzována pomocí GeneMapper 5 Softwaru. Obrázek 5 reprezentuje výsledky analýzy variant v promotoru genu *TERT* získané výše zmíněným postupem.



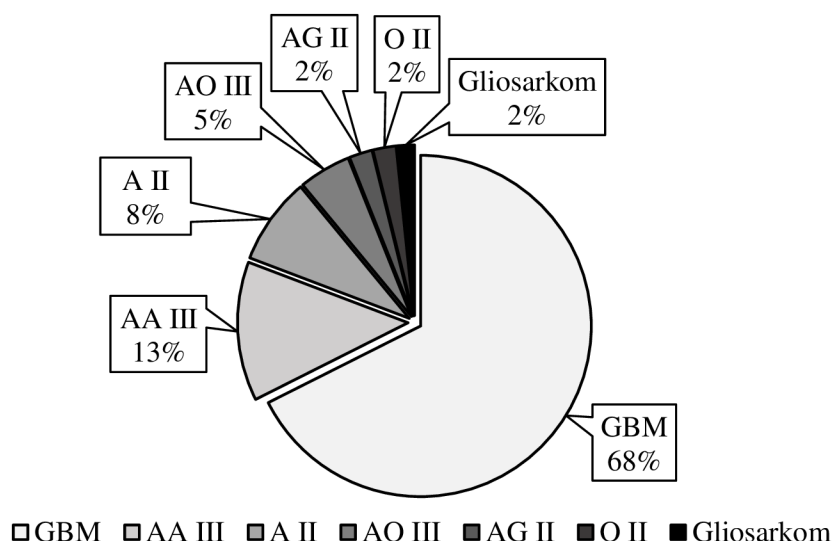
Obr. 5: Reprezentativní výsledek detekce mutací promotoru genu *TERT*, získaný pomocí GeneMapper 5 Softwaru. Osa x představuje délku fragmentu DNA a osa y intenzitu fluorescenčního signálu značeného nukleotidu. Modře značený pík odpovídá navázanému guaninu a zelená barva znázorňuje adenin. Test varianty detekuje na komplementárním vlákně. (A) Reprezentativní vzorek nevykazující mutace promotoru *TERT*. (B) Reprezentativní vzorek znázorňující mutaci promotoru *TERT* C228T. (C) Reprezentativní vzorek znázorňující mutaci promotoru *TERT* C250T.

4.2 Výsledky

4.2.1 Retrospektivní molekulárně genetická analýza gliomů

Do retrospektivní molekulárně genetické analýzy bylo zahrnuto celkem 182 patientských vzorků s potvrzeným gliálním nádorem. Všichni pacienti zahrnutí v souboru podstoupili resekci nebo biopsii tumoru mezi lety 2018 – 2022 a v době odběru byli starší 18ti let. Všechna molekulárně genetická a cytogenetická data byla získána společností EUC Laboratoře CGB, a.s., Ostrava. Vzhledem k tomu, že soubor patientských vzorků je z širokého datového rozmezí, přičemž v roce 2021 došlo ke změnám v klasifikaci nádorů CNS, je zkoumaný soubor kombinací dvou klasifikačních způsobů. Důsledkem je, že některé vzorky diagnostikované mezi lety 2018 až 2021 neodpovídají přesně nynější Klasifikaci nádorů CNS dle WHO z roku 2021 (WHO CNS5 2021).

U všech vzorků byla provedena jak histologická, tak molekulární diagnóza. V souboru bylo 15 diagnostikovaných astrocytomů, grade II (A II), 4 gemistocytární astrocytomy, grade II (AG II), 24 anaplastických astrocytomů, grade III (AA III), 9 anaplastických oligodendrogliomů, grade III (AO III), 4 oligodengrogliomy, grade II (O II), 123 glioblastomů (GBM) a 3 gliosarkomy. Procentuální zastoupení všech gliálních nádorů v souboru zobrazuje Obrázek 6.



Obr. 6: Procentuální zastoupení všech gliálních nádorů v souboru patientských vzorků (n = 182). (A II – astrocytom, grade II; AA III – anaplastický astrocytom, grade III; AG II – astrocytom gemistocytární, grade II; GBM – glioblastom; Gliosarkom; O II – oligodendrogliom, grade II; AO III – anaplastický oligodendrogliom, grade III).

Vyšší zastoupení v souboru tvořili muži (56,6 %) oproti ženám (43,4 %). Nejmladšímu pacientovi bylo v době operace 19 let a nejstaršímu 79 let (medián věku 56,5 let). Obecně nejvyšším věkem v době diagnózy disponovali pacienti, kterým byl diagnostikován GBM (medián 60 let), gliosarkom (medián 63 let) a pacienti s AO III (medián 60 let). Pacienti s astrocytárními gliomy byli významně mladší. Mediány věků u jednotlivých histologických diagnóz byly shrnuty do Tabulky 8.

Tab. 8: Medián věku u jednotlivých histologických diagnóz

| Nádorový subtyp | Zastoupení v souboru (n = 182) | Medián věku [roky] |
|--|-----------------------------------|--------------------|
| Astrocytom, grade II | 15 | 42 |
| Astrocytom anaplastický, grade III | 24 | 47 |
| Astrocytom gemistocytární, grade II | 4 | 39 |
| Glioblastom | 123 | 60 |
| Gliosarkom | 3 | 63 |
| Oligodendrogliom, grade II | 4 | 46 |
| Anaplastický oligodendrogliom, grade III | 9 | 60 |

Molekulární diagnostika zahrnovala detekci mutací v genech *IDH1* a *IDH2*, detekci mutací v promotoru genu *TERT* a vyšetření metylačního statusu promotoru genu *MGMT*. Mutace v genech *IDH1/2* a promotoru genu *TERT* byly standardně vyšetřeny pomocí metody SNaPshot a detekce metylace promotoru genu *MGMT* byla zajištěna pomocí N-MSP.

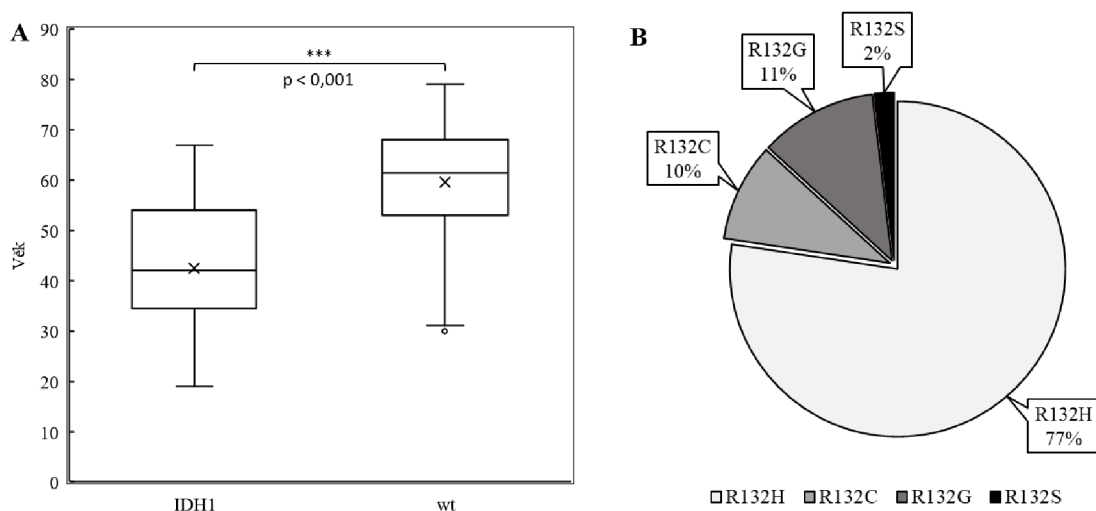
Cytogenetická analýza se soustředila na detekci amplifikace *EGFR*, delecí bialeické delecce *CDKN2A*, delecí genu *PTEN* (monozomie chromozomu 10) a početní změny chromozomů 1, 7, 10 a 19 pomocí metody i-FISH.

V teoretické části bakalářské práce byly popsány vztahy mezi jednotlivými mutacemi a genetickými aberacemi u konkrétních nádorových typů. Níže jsou uvedeny všechny zjištěné molekulárně – genetické znaky a jejich vztahy napříč analyzovaným souborem pacientů s gliomem.

4.2.1.1 Mutační analýza isocitrátdehydrogenázy 1/2

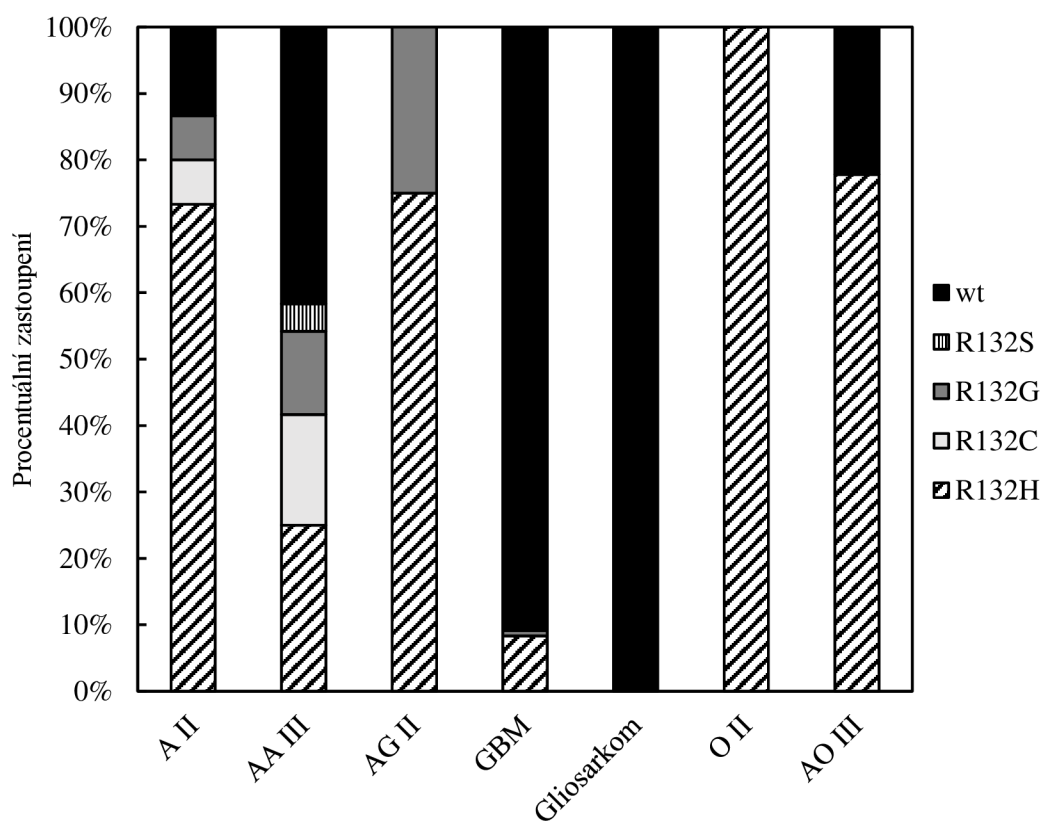
Zjištění stavu mutace genu *IDH* je základním molekulárním vyšetřením u každého nově diagnostikovaného difúzního gliomu. V současnosti je na stavu mutace *IDH* postavena celá klasifikace gliálních nádorů.

Analyzovaný soubor obsahoval 182 patientských vzorků, z čehož byla u 53 pacientů detekována mutace v genu *IDH*. Zbylých 126 pacientů nevykazovalo mutaci v genu *IDH* a u 3 pacientů nebyla provedena molekulární diagnostika. Pacienti pozitivní na mutaci v genu *IDH* tvořili 29,6 % (53/179) z celého souboru, který zahrnoval pouze vzorky, u kterých byl proveden test na zjištění stavu mutace. Toto procentuální zastoupení se zároveň rovnalo počtu zjištěných mutací v *IDH1*, jelikož mutace *IDH2* nebyla v celém souboru pozorována. Jak bylo popsáno v kapitole 3.4.2.1, mutace *IDH1* souvisí s věkem pacientů a je spojována především s mladším věkem. Pomocí studentova t-testu byla zjištěna statisticky významná souvislost mezi věkem a mutačním statusem *IDH* ($p < 0,001$) (Obr. 7A). Věkové rozmezí pacientů s některou z mutací v genu *IDH1* bylo 19 - 67 let a medián věku 42 let. U pacientů bez mutace bylo věkové rozmezí 31 – 79 let a medián věku 61,5 let. Nejčastěji detekovanou variantou mutace *IDH1* byl typ R132H, který byl zaznamenán u 41 pacientů (77,4 %) (Obr. 7B). Méně frekventovanými mutacemi *IDH1* byly R132G u 6 pacientů (11,3 %), R132C u 5 pacientů (9,4 %) a R132S nalezena u 1 ze vzorků (1,9 %).



Obr. 7: (A) Krabicový diagram znázorňující vztah mezi věkem pacientů a mutovaným nebo nemutovaným genem (wt) isocitrátdehydrogenázy 1 (*IDH1*) v souboru o 179 pacientech. Medián věku pacientů s mutací *IDH1* byl 42 let, což je významně nižší než u pacientů s normálním genotypem, kde byl medián 61,5 let. (B) Procentuální zastoupení všech mutovaných variant genu *IDH1* z celého souboru zjištěných mutací v genu *IDH1* (53/179).

Byla pozorována frekvence zastoupení jednotlivých mutací i u konkrétních nádorových typů (Obr. 8). U všech nádorových typů, u kterých byly nalezeny mutace v genu *IDH1* bylo shledáno, že největší zastoupení tvořily mutace R132H. U astrocytomů a oligodendrogliomů byly všechny vzorky pozitivní na některou z mutací *IDH1*. Procentu astrocytárních a oligodendroglálních nádorů, u kterých byl nalezen nemutovaný gen (wt z anglického wildtype) *IDH1* i *IDH2*, by podle aktuální klasifikace WHO CNS5 2021, s ohledem na cytogenetické a histologické vyšetření, byla přiřazena jiná diagnóza. Reklasifikace těchto vzorků byla shrnuta v kapitole 4.2.1.5. Glioblastomy a gliosarkomy byly na mutace v genu *IDH1* naopak převážně negativní. V případě diagnostikovaných GBM se mutace vyskytla pouze u 11 ze 120 případů, konkrétně R132H (8,3 %) a R132G (0,8 %). Vzhledem k tomu, že mutace genu *IDH1* a diagnóza glioblastomu spolu podle klasifikace WHO CNS5 2021 nekorrespondují, byly stejně jako výše zmíněné astrocytomy, zahrnuty do reklasifikace v kapitole 4.2.1.5.

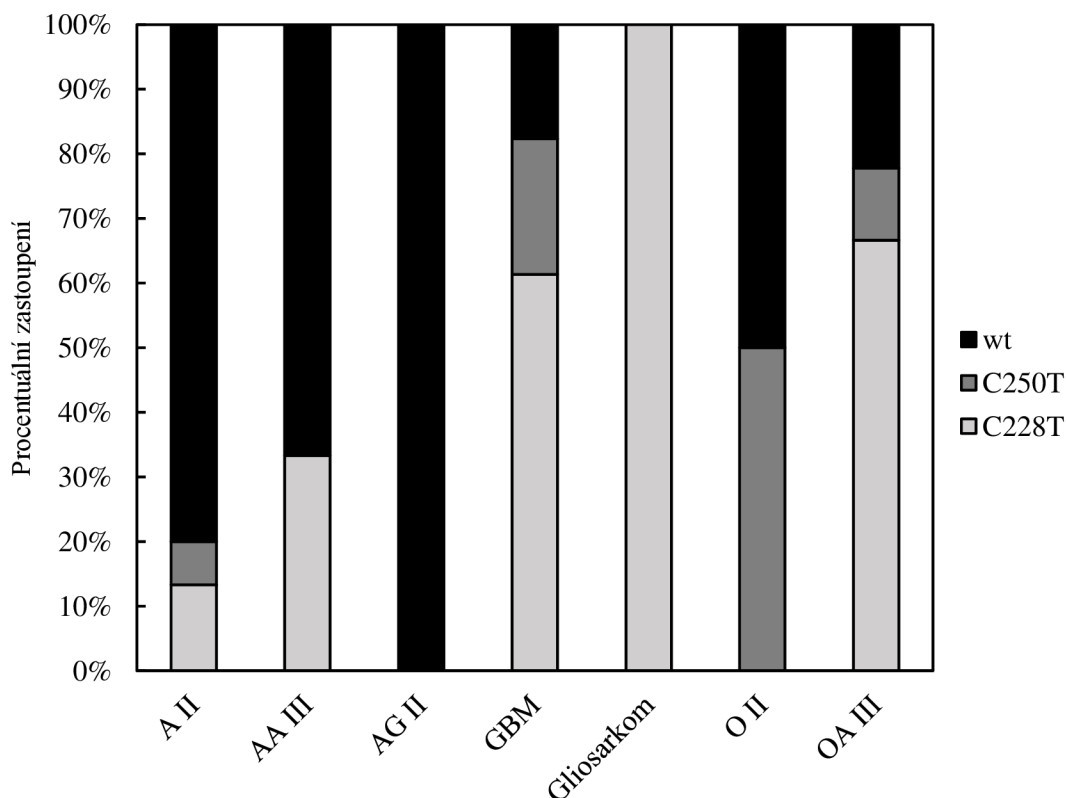


Obr. 8: Procentuální zastoupení mutací genu isocitrátdehydrogenázy 1 (*IDH1*) - R132H, R132C, R132G a R132S u jednotlivých typů gliomů (A II – astrocytom, grade II; AA III – anaplastický astrocytom, grade III; AG II – astrocytom gemistocytární, grade II; GBM – glioblastom; Gliosarkom; O II – oligodendrogliom, grade II; AO III – anaplastický oligodendrogliom, grade III).

4.2.1.2 Mutační analýza promotoru telomerázy reverzní transkriptázy

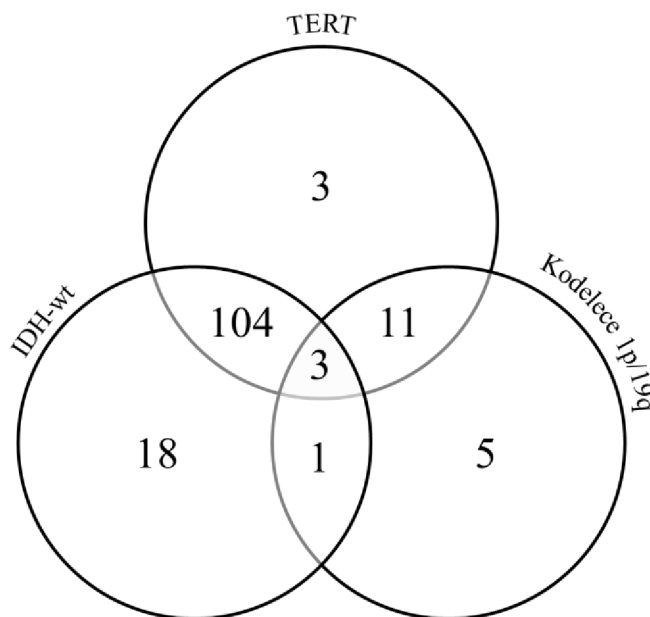
Detekce mutací v promotoru genu *TERT* je dalším významným molekulárním markerem využívaným k upřesnění diagnózy, který začal být rutinně vyšetřován po zavedení nové klasifikace. Jak bylo zmíněno v kapitole 4.1, z důvodu zavedení nové klasifikace gliálních nádorů, bylo provedeno retrospektivní dovyšetření mutací promotoru genu *TERT* u vzorků, které byly diagnostikovány před zavedením nových klasifikačních způsobů. Ze 182 pacientů v souboru, bylo vyšetření stavu mutace promotoru genu *TERT* provedeno u 178 pacientů s dostupným vzorkem.

Téměř u všech nádorových typů byla nalezena některá ze dvou mutací promotoru *TERT* – C228T nebo C250T. Mutace v promotoru genu *TERT* byly nalezeny především u GBM, gliosarkomů a oligodendroglálních nádorů (O II, AO III) (Obr. 9). U astrocytárních nádorů (A II, AA III a AG II) se mutace *TERT*, oproti normálnímu genotypu, vyskytovaly v menším zastoupení. Některou z bodových mutací promotoru *TERT* disponovalo celkově 121/178 tumorů, z toho 92 vzorků (> 75 %) bylo pozitivní na mutaci C228T a 29 (< 25 %) na mutaci C250T.



Obr. 9: Distribuce mutací promotoru telomerázové reverzní transkriptázy (*TERT*) u jednotlivých typů gliomů (A II – astrocytom, grade II; AA III – anaplastický astrocytom, grade III; AG II – astrocytom gemistocytární, grade II; GBM – glioblastom; Gliosarkom; O II – oligodendrogliom, grade II; AO III – anaplastický oligodendrogliom, grade III).

Dále byla testována souvislost mezi mutacemi v promotoru genu *TERT*, chromozomovou kodelecí 1p/19q a *IDH* genotypem (Obr. 10). Chromozomová kodelece ramen 1p/19q, byla nalezena ve 20 vzorcích. U 14/20 (70,0 %) byla také přítomna mutace promotoru genu *TERT*. Následně byla analyzována souvislost mezi mutací promotoru *TERT* a *IDH* genotypem. Celkem 126 pacientů nemělo žádnou z mutací genu *IDH* avšak 85,0 % (107/126) vzorků bylo pozitivních na mutaci promotoru genu *TERT*.

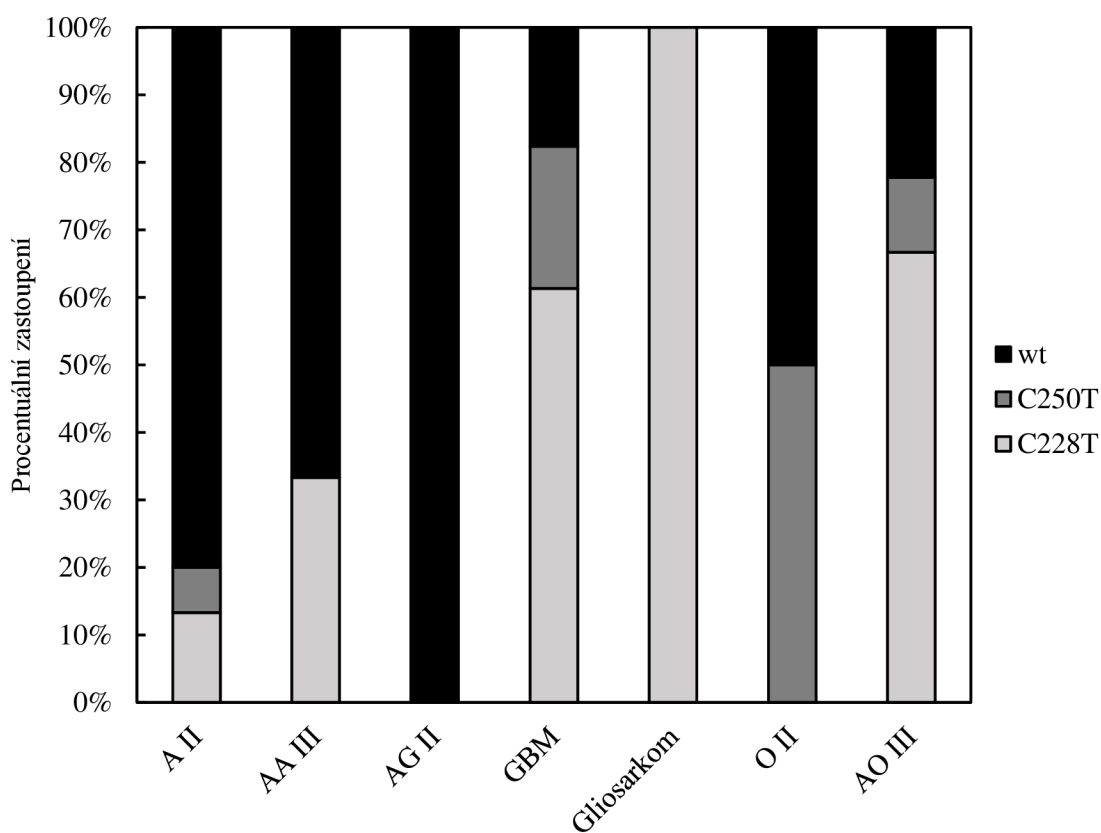


Obr. 10: Vennův diagram znázorňující vztahy mezi mutacemi promotoru telomerázové reverzní transkriptázy (*TERT*), genem isocitrátdehydrogenázy (*IDH*) a kodelecí chromozomových ramen 1p/19q.

4.2.1.3 Metylační analýza promotoru O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferasy

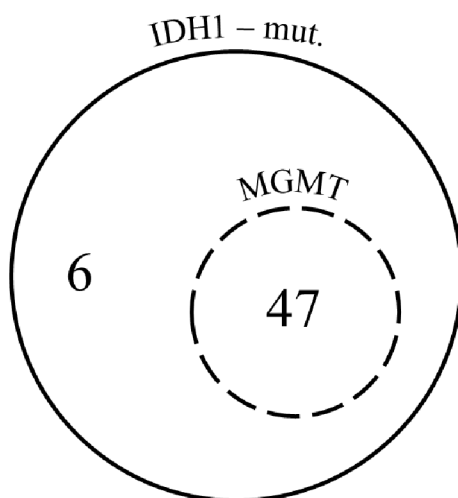
Analýza promotoru genu *MGMT* byla provedena pomocí N-MSP u 178 vzorků z celého souboru. Celkem bylo 134 vzorků pozitivních na metylaci v promotoru *MGMT*.

Jak bylo popsáno v kapitole 3.7.1 znalost metylačního statusu promotoru genu *MGMT* je podstatná především u glioblastomů. Pacienti s GBM byli na metylaci promotoru pozitivní v 73,9 % (88/119) (Obr. 11). Lze předpokládat, že toto procento pacientů mělo v minulosti lepší odpověď na léčbu alkylačními cytostatiky, než zbylých 26,1 % (31/119) u kterých nebyla metylace potvrzena.



Obr. 11: Graf znázorňující procentuální zastoupení nádorů s metylovaným a nemetylovaným fenotypem mezi jednotlivými typy gliomů (A II – astrocytom, grade II; AA III – anaplastický astrocytom, grade III; AG II – astrocytom gemistocytární, grade II; GBM – glioblastom; Gliosarkom; O II – oligodendrogliom, grade II; AO III – anaplastický oligodendrogliom, grade III).

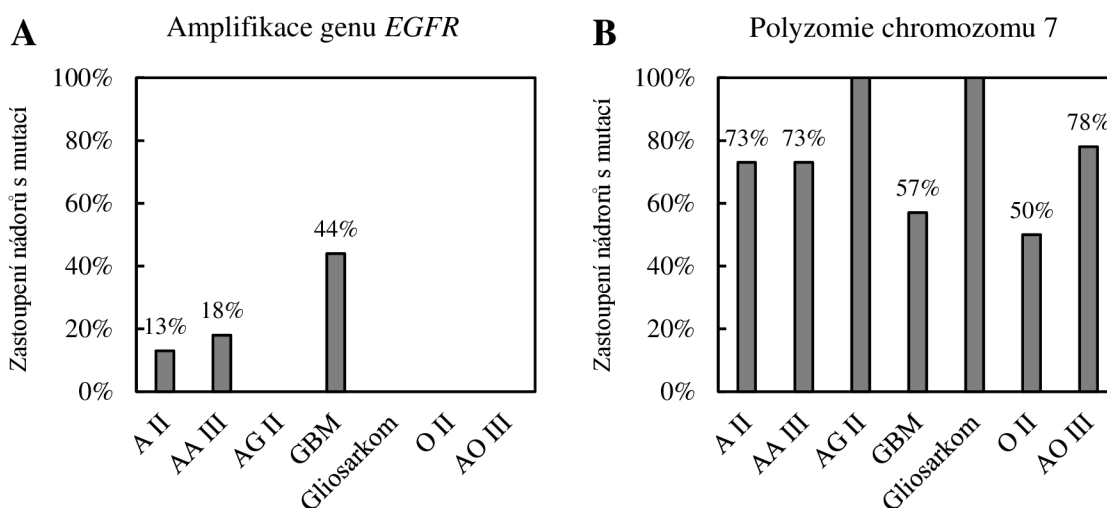
V předchozí části zabývající se mutační analýzou genu *IDH* bylo v kapitole 4.2.1.1 uvedeno, že mutace v genu *IDH1* byla nalezena u 53 vzorků v souboru. Celkem 88,7 % (47/53) pacientů u kterých byla nalezena mutace v genu *IDH1* mělo současně pozitivní nález při analýze metylace promotoru genu *MGMT* (Obr. 12). Pouze 6 pacientů s mutací v genu *IDH1* nebylo na metylaci pozitivní. Pomocí chí-kvadrát testu (χ^2) byla prokázána statisticky významná souvislost mezi mutacemi v genu *IDH1* a metylací promotoru *MGMT* ($p = 0,0048$). Současně u vzorků, které mutace v genu *IDH1* nevykazovaly, byla metylace promotoru genu *MGMT* nalezena u 69,6 % (87/125).

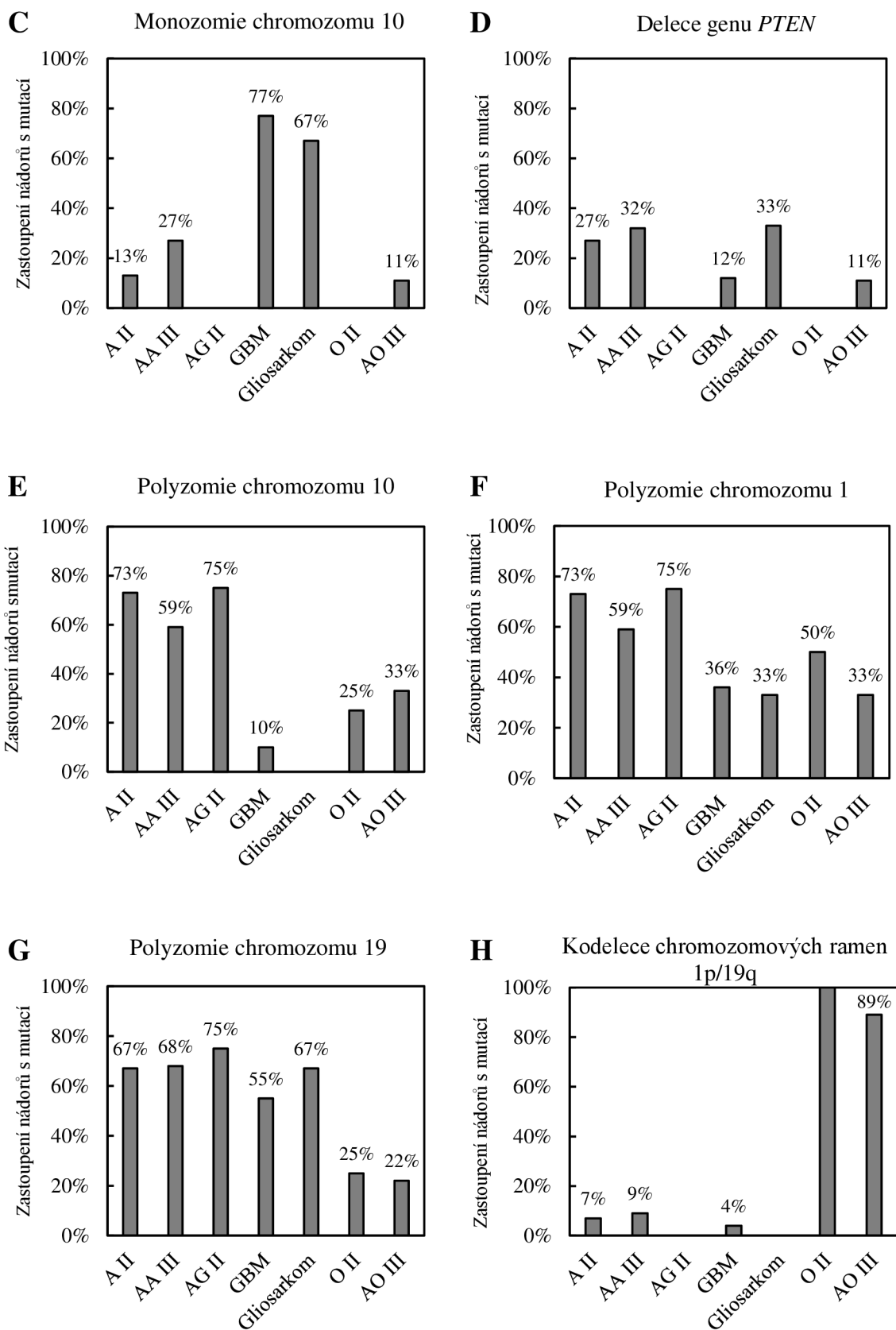


Obr. 12: Grafické znázornění vztahu mezi mutacemi genu isocitrátdehydrogenázy 1 (*IDH1*) a metylací promotoru O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferasy (*MGMT*).

4.2.1.4 Analýza cytogenetických aberací

Statistické zpracování bylo provedeno i u cytogenetických aberací všech analyzovaných vzorků v souboru (Obr. 13). Amplifikace genu *EGFR* byla potvrzena u 33,1 % (58/175), polyzomie chromozomu 7 u 62,9 % (110/175), monozomie chromozomu 10 u 58,3 % (102/175), delece genu *PTEN* u 15,4 % (27/175), polyzomie chromozomu 10 u 24,6 % (43/175), polyzomie chromozomu 1 u 43,1 % (75/174), polyzomie chromozomu 19 u 56,0 % (98/175) a kodelece chromozomových ramen 1p/19q byla nalezena u 11,6 % (20/173) patientských vzorků (Obr. 13; Tab. 9). Byl zkoumán i zisk nadbytečných kopií chromozomu 7 a současná ztráta chromozomu 10 [+7/-10]. Tento trend byl nalezen u 36,4 % (43/118) GBM, 66,7 % (2/3) gliosarkomů, 11,1 % (1/9) AO III a u 9,1 % (2/22) AA III. Současně bylo pozorováno, že AO III, který vykazoval v jednom případě status [+7/-10] byl negativní na mutace v genu *IDH1*. To znamená, že by podle aktuální klasifikace nebyl hodnocen jako oligodendrogliom, nýbrž jako Glioblastom, IDH-wildtype a mutační status [+7/-10] by korespondoval se správnou diagnózou. Stejně je tomu i u jednoho z AA III, který stejně jako AO III nevykazoval mutace v genu *IDH1* a byl by hodnocen jako Glioblastom, IDH-wildtype. Na druhou stranu [+7/-10] vykazovaly i dva GBM, které současně byly pozitivní na některou z mutací v genu *IDH1*. Tyto poznatky umožnily reklasifikovat soubor gliomů (kapitola 4.2.1.5).





Obr. 13: Přehled detekovaných genetických aberací (A-H) a jejich procentuální zastoupení u jednotlivých typů gliomů (A II – astrocytom, grade II; AA III – anaplastický astrocytom, grade III; AG II – astrocytom gemistocytární, grade II; GBM – glioblastom; Gliosarkom; O II – oligodendrogliom, grade II; AO III – anaplastický oligodendrogliom, grade III).

Kromě genetických aberací uvedených výše, byly u některých vzorků detekovány i alelické ztráty 1p36 a 19q13. Ztráta chromozomového lokusu 1p36 byla potvrzena u 10,1 % (18/178) analyzovaných vzorků. Ke ztrátám došlo konkrétně u 4,3 % (1/23) AA III a u 13,3 % (16/120) GBM. Ztráta alely 19q13 byla taktéž potvrzena u 10,1 % (18/178) všech gliomů. Delece byla potvrzena u 6,7 % (1/15) A II, 25,0 % (1/4) AG II a 13,3 % (16/120) GBM.

U vzorků odebraných v roce 2022 byla provedena analýza bialelické delece genu *CDKN2A*. Nález byl pozitivní u 25,0 % (4/16) gliomů, u nichž byla analýza provedena. Delece byla pozorována u 33,3 % (1/3) A II a 23,1 % (3/13) GBM.

Tab. 9: Molekulárně genetické aberace napříč studovaným souborem pacientů (n = 182) a jejich procentuální zastoupení u jednotlivých nádorových typů.

| Histologická diagnóza | n | Molekulárně-genetické aberace | | | | | | | | | | |
|---|-----|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | Mutace <i>IDH1</i> | Mutace promotoru <i>TERT</i> | Methylace promotoru <i>MGMT</i> | <i>EGFR</i> amplifikace | Polyzomie 7 | Monozomie 10 | Delece <i>PTEN</i> | Polyzomie 10 | Polyzomie 1 | Polyzomie 19 | Kodelece 1p/19q |
| Astrocytom, IDH-mutovaný | 15 | 13/15 (86,6 %) | 3/15 (20,0 %) | 11/15 (73,3 %) | 2/15 (13,3 %) | 11/15 (73,3 %) | 2/15 (13,3 %) | 4/15 (26,7 %) | 11/15 (73,3 %) | 11/15 (73,3 %) | 10/15 (66,7 %) | 1/15 (6,7 %) |
| Anaplastický astrocytom, IDH-mutovaný | 24 | 14/24 (58,3 %) | 8/24 (33,3 %) | 20/24 (83,3 %) | 4/22 (18,2 %) | 16/22 (72,7 %) | 6/22 (27,3 %) | 7/22 (31,8 %) | 13/22 (59,1 %) | 13/22 (59,1 %) | 15/22 (68,2 %) | 2/21 (9,5 %) |
| Gemistocytární astrocytom, IDH-mutovaný | 4 | 4/4 (100 %) | 0/4 (0,0 %) | 3/4 (75,0 %) | 0/4 (0,0 %) | 4/4 (100,0 %) | 0/4 (0,0 %) | 0/4 (0,0 %) | 3/4 (75,0 %) | 3/4 (75,0 %) | 3/4 (75,0 %) | 0/4 (0,0 %) |
| Oligodendrogliom, IDH-mutovaný s kodelecí 1p/19q | 4 | 4/4 (100 %) | 2/4 (50,0 %) | 4/4 (100,0 %) | 0/4 (0,0 %) | 2/4 (50,0 %) | 0/4 (0,0 %) | 0/4 (0,0 %) | 1/4 (25,0 %) | 2/4 (50,0 %) | 1/4 (25,0 %) | 4/4 (100,0 %) |
| Anaplastický oligodendrogliom, IDH-mutovaný s kodelecí 1p/19q | 9 | 7/9 (77,8 %) | 7/9 (77,8 %) | 8/9 (88,9 %) | 0/9 (0,0 %) | 7/9 (77,8 %) | 1/9 (11,1 %) | 1/9 (11,1 %) | 3/9 (33,3 %) | 3/9 (33,3 %) | 2/9 (22,2 %) | 8/9 (88,9 %) |
| Glioblastom, IDH-wildtype | 123 | 11/120 (9,2 %) | 98/119 (82,3 %) | 88/119 (73,4 %) | 52/118 (44,1 %) | 67/118 (56,8 %) | 91/118 (77,1 %) | 14/118 (11,9 %) | 12/118 (10,2 %) | 42/117 (35,9 %) | 65/118 (55,1 %) | 5/117 (4,3 %) |
| Gliosarkom | 3 | 0/3 (0,0 %) | 3/3 (100,0 %) | 0/3 (0,0 %) | 0/3 (0,0 %) | 3/3 (100,0 %) | 2/3 (66,7 %) | 1/3 (33,3 %) | 0/3 (0,0 %) | 1/3 (33,3 %) | 2/3 (66,7 %) | 0/3 (0,0 %) |
| Celkem | 182 | 53/179 (29,6 %) | 121/178 (68,0 %) | 134/178 (75,3 %) | 58/175 (33,1 %) | 110/175 (62,9 %) | 102/175 (58,3 %) | 27/175 (15,4 %) | 43/175 (24,6 %) | 75/174 (43,1 %) | 98/175 (56,0 %) | 20/173 (11,6 %) |

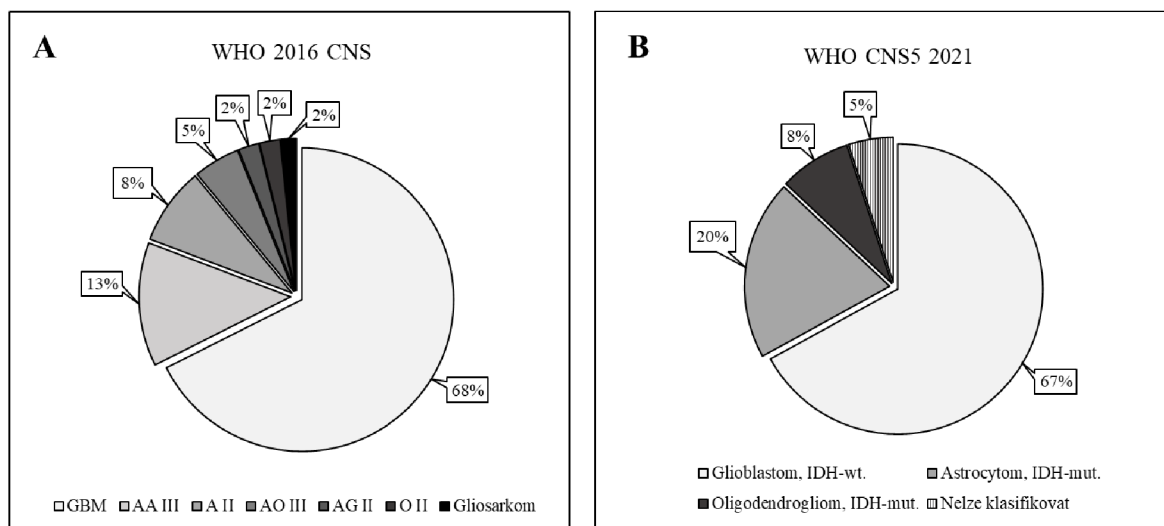
4.2.1.5 Reklasifikace gliomů podle WHO CNS5 2021

Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.2.1, vzorky v této analýze byly diagnostikovány pomocí dvou různých klasifikačních doporučení. Materiál (113/182) odebraný mezi lety 2018 – 2022 byl hodnocen podle doporučení vydaných WHO v roce 2016 (WHO 2016 CNS) a zbylé vzorky (69/182) byly klasifikovány podle aktuální Klasifikace nádorů CNS vydané WHO v roce 2021 (WHO CNS5 2021). Podle platných diagnostických kritérií uvedených ve WHO CNS5 2021 byla provedena reklasifikace vzorků, které byly diagnostikovány před zavedením nové klasifikace.

Zásadním prvkem umožňujícím reklasifikaci dříve diagnostikovaných gliomů, je v současné době znalost mutačního statusu genu *IDH1/2*. Veškeré vzorky pozitivní na mutaci v genu *IDH* byly hodnoceny jako potenciální **Astrocytomy, IDH-mutant**. Aby mohl být vzorek hodnocen jako Astrocytom, IDH-mutant musel být pozitivní na mutaci *IDH* a zároveň negativní na chromozomovou kódelecí ramen 1p/19q. Zastoupení vzorků splňující tyto podmínky bylo 20,3 % (36/173) z celého souboru pacientů, u kterých mohla být reklasifikace provedena. Zbylé vzorky pozitivní na mutaci v genu *IDH* musely současně vykazovat chromozomovou kódelecí ramen 1p/19q, aby mohly být hodnoceny jako **Oligodendrogliomy, IDH-mutant s kódelecí 1p/19q**. Reklasifikace gliomu, jako oligodendrogliom, byla podpořena v případě, že vzorek s dříve zmíněnými dvěma mutacemi vykazoval současně pozitivní mutaci v promotoru genu *TERT*. V celém souboru bylo nalezeno 15 oligodendrogliomů, které odpovídaly 8,7 % z celku.

Posledním difúzním gliomem dospělého typu byl **Glioblastom, IDH-wildtype**. Pro diagnostiku vzorku, jako Glioblastom, IDH-wildtype muselo být splněno hned několik podmínek. Vzorek musel být negativní na mutaci v genu *IDH1/2* a musel vykazovat alespoň jednu z následujících mutací: amplifikace *EGFR*, mutace promotoru *TERT* nebo numerické alterace chromozomů 7 a 10 [+7/-10]. Množství vzorků splňující kritéria bylo 70,5 % (122/173) z celého souboru.

U 9 vzorků nebylo možné gliom správně diagnostikovat. Tyto vzorky nesplňovaly kritéria pro zařazení k některému ze tří nádorových typů. Jednalo se převážně o nereprezentativní vzorky, nebo nebyla nalezena žádná z přidružených mutací, která by podpořila jejich diagnózu. Porovnání mezi oběma klasifikačními systémy, a naším souborem pacientů, je zobrazeno na Obrázku 14.



Obr. 14: Porovnání analyzovaného souboru klasifikovaného dle WHO 2016 CNS (A) a stejného souboru reklasifikovaného dle WHO CNS 2021 (B); A II – astrocytom, grade II; AA III – anaplastický astrocytom, grade III; AG II – astrocytom gemistocytární, grade II; GBM – glioblastom; Gliosarkom; O II – oligodendrogliom, grade II; AO III – anaplastický oligodendrogliom, grade III.

Nejvýznamnější reklasifikace proběhla zejména u AA III, kdy bylo 8/24 vzorků reklasifikováno na Glioblastom, IDH-wildtype. Jako Glioblastom, IDH-wildtype byly reklasifikovány i 2/9 AO III a 2/15 A II. Současně došlo i k reklasifikaci některých GBM (9/126) a některých AO III (2/9) na Astrocytom, IDH-wildtype. Díky znalosti mutačního statusu genu *IDH* a kodelece chromozomových ramen 1p/19q bylo možné reklasifikovat některé vzorky na Oligodendrogliom, IDH-mutant s kodelecí 1p/19q. K této změně došlo u 1/15 A II, 2/24 AA III a 1/126 GBM.

5 DISKUSE

V předkládané práci byl analyzován soubor o 182 pacientech, kterým byl diagnostikován difúzní gliom dospělého typu. Nejčastěji zastoupeným gliomem v souboru byl glioblastom, který představoval 67,6 % (123/182) ze všech difúzních gliomů. Ze statistické zprávy CTBRUS (Centrální registr mozkových nádorů Spojených států z anglického Central Brain Tumor Registry of the United States) taktéž vyplývá, že mezi gliomy diagnostikovanými mezi lety 2015 – 2019, byl nejčastěji zastoupeným gliomem právě GBM (59,2%). Současně uvádí, že astrocytární nádory, včetně GBM, v těchto letech představovaly 78 % všech gliomů zahrnutých v analýze. Naše data taktéž naznačují, že četnost astrocytárních tumorů, včetně GBM, převažovala nad oligodendroglíálními nádory (92,9 %). Co se týče zastoupení jednotlivých pohlaví v souboru, i zde byla nalezena shoda se statistickou zprávou CTBRUS, kde bylo uvedeno větší zastoupení u mužů oproti ženám, stejně tak, jako v kohortě našich pacientů (muži - 56,6 %; ženy - 43,4 %) (Ostrom et al., 2022).

Dále bylo hodnoceno zastoupení jednotlivých genových variant u všech typů gliomů. Mutace v genu *IDH* vykazoval pouze gen *IDH1* v kodonu 132 a frekvence těchto mutací byla nejvyšší u astrocytárních a oligodendroglíálních tumorů, což koresponduje se studií Balsee et al. z roku 2008, kde bylo navíc uvedeno, že ve většině případů došlo k záměně argininu za histidin v poloze 132 (R132H). Stejně tak i v našem souboru byla mutace R132H nejvíce zastoupenou (77,4 %) a zbylé typy se objevovaly pouze zřídka. Současně nebyl pozorován žádný trend mezi konkrétními mutacemi v genu *IDH1* a určitým typem gliomu (Balss et al., 2008). Na základě analýzy Parsonse et al. byla zkoumána souvislost mezi věkem pacientů a mutačním statutem genu *IDH1*. Stejně jako ve zmíněné studii, i kohorta našich pacientů vykazovala významnou souvislost mezi mladší věkem a mutacemi v genu *IDH1* (Parsons et al., 2008).

Mutační analýzou promotoru genu *TERT* byl nejen doplněn soubor o důležitý diagnostický marker, ale byla také zhodnocena četnost variant pro jednotlivé histologické typy. Mutace promotoru genu *TERT* byly nejčastěji zastoupeny u oligodendroglíálních nádorů (O II, AO III), GBM a gliosarkomů. Tento výsledek byl identicky popsán v jiných studiích (Arita et al., 2013; Killela et al., 2014; Yuan et al., 2016). Ve studii Arita et. al byla pozorována silná souvislost mezi mutacemi v genu *TERT* a kodeleci chromozomových ramen 1p/19q. Současně byla ve studii diskutována i souvislost mezi mutacemi v promotoru genu *TERT* a nemutovaným statutem genu *IDH* bez kodelece 1p/19q, která byla popsána, jako důležitá pro vývoj GBM a oligodendroglíálních nádorů (Arita et al., 2013). Souvislosti

mezi mutacemi promotoru genu *TERT*, genem *IDH* a kódelecí 1p/19q byly nalezeny i v této kohortě patientských vzorků. Dále byly též pozorovány frekvence výskytu jednotlivých mutací promotoru genu *TERT*, kdy mutace C228T převažovaly nad výskytem mutací C250T (Arita et al., 2013; Mosrati et al., 2015).

Vzhledem k nedostupnosti detailních informací, ohledně doby přežití jednotlivých pacientů a způsobu jejich léčby, nelze hodnotit míru přežití v závislosti na metylačním statusu promotoru genu *MGMT*. Můžeme se pouze domnívat, že pacienti s GBM, jež vykazovali metylační status promotoru genu *MGMT*, disponovali lepším celkovým přežitím a odpovědí na léčbu, oproti pacientům, u kterých nebyla metylace promotoru nalezena. (Gilbert et al., 2013). V jiných studiích byla diskutována i prognostická užitečnost metylačního statusu promotoru genu *MGMT* v závislosti na typu adjuvantní léčby. Touto otázkou se zabývali Olson et al. ve své metaanalýze. Došli k závěru, že epigenetické umlčení genu *MGMT* má největší přínos při léčbě chemoterapeutiky, střední přínos při léčbě radioterapií a žádný přínos u pacientů jimž byl nádor pouze odstraněn (Olson et al., 2011).

V části zabývající se analýzou cytogenetických aberací v souboru, bylo pozorováno zastoupení jednotlivých aberací v závislosti na nádorových typech. Podobně, jako ve studii Smitha et al. byly nalezeny změny v genu *EGFR* zejména u GBM a v menším zastoupení i u AA III. Smith et al. současně popisuje, že změny v genu *PTEN* byly méně časté u AA III oproti GBM. To se ovšem v této analýze nepotvrdilo, a byl pozorován opačný výsledek (Smith et al., 2001). Změny počtu kopií chromozomů 7 a 10 [+7/-10] byly nalezeny zejména u GBM. Monozomie chromozomu 10 je popisována, jako nejčastější genetická alterace GBM (60 – 80 %) (Ohgaki, 2005) a i v našem souboru byla nalezena u 77 % GBM a 67 % gliosarkomů. Popsána byla také bialelická delece genu *CDKN2A*, která byla v roce 2021 nově zařazena do Klasifikace nádorů centrální nervové soustavy vydané WHO, jako nezávislý prediktor negativní prognózy. Ovšem laboratorně byla vyšetřována až od roku 2022 (Huang, 2022), proto je v našem souboru na alterace genu *CDKN2A* vyšetřeno pouze malé procento vzorků. Vzhledem k tomu, že změny vykazovalo velmi malé množství vzorků nebylo možné zhodnotit jejich prevalenci v celém souboru.

Nová klasifikace nádorů představuje několik výhod pro stanovení prognózy a predikce u pacientů s gliomem. Na základě molekulárních rysů nádoru, dokáže nový systém lépe předpovědět celkové přežití pacientů a přizpůsobit jim konkrétní cílenou léčbu. V budoucnu by bylo vhodné doplnit analyzovanou kohortu pacientů o vyšetření na přítomnost bialelické delece genu *CDKN2A*. Vzhledem k tomu, že se jedná o jeden z nejdůležitějších biomarkerů, zejména v určování histologických stupňů malignity u

Astrocytomů, IDH-mutant, by znalost případné alterace tohoto genu vedla k doplnění reklasifikace a ke zlepšené stratifikaci pacientů. Doplněná reklasifikace by teoreticky mohla být využita k případnému přehodnocení cílené léčby u konkrétních pacientů zahrnutých v analýze.

6 ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce, která se zabývala somatickými genovými mutacemi a vybranými cytogenetickými změnami, byla provedena literární rešerše shrnující hlavní molekulárně-genetické aberace pro konkrétní nádory spadající do rodiny difúzních gliomů dospělého typu.

Současně byl sestaven soubor pacientů, jimž byl mezi lety (2018 – 2022) diagnostikován difúzní gliom, a to včetně jejich molekulárně-patologických charakteristik. Celkem bylo do analýzy zařazeno 182 pacientů. U 74 pacientů bylo doplněno vyšetření mutačního statusu promotoru genu *TERT* pomocí metody SNaPshot assay.

V práci byly zhodnoceny nejdůležitější rutinně vyšetřované somatické mutace a cytogenetické alterace vyšetřovaných chromozomů u gliomů. Pro všechny typy gliomů byly vypočteny frekvence výskytu jednotlivých změn a byly analyzovány jejich vzájemné vztahy. Byla zjištěna souvislost mezi věkem pacientů a mutacemi v genu *IDH1*, korelace mezi metylacemi promotoru genu *MGMT* a mutacemi v genu *IDH1* nebo vztah mezi mutacemi v promotoru genu *TERT* a kódelecemi chromozomových ramen 1p/19q či mutacemi v promotoru genu *TERT* a standardním genotypem *IDH*.

Na základě znalosti genetických změn u jednotlivých typů gliomů, byla provedena reklasifikace všech vzorků, dle Klasifikace nádorů CNS z roku 2021 vydané WHO (WHO CNS5 2021). Povedlo se tak stratifikovat pacienty do příslušných skupin podle molekulárně-genetického profilu. Zároveň bylo porovnáno i rozložení sledované kohorty před a po provedení reklasifikace. Nová klasifikace umožňuje přesněji odhadnout prognózu pacientů s gliomy a predikovat jejich odpověď na cílenou terapii. Přispívá tak ke zlepšení léčebných výsledků a kvality života pacientů s gliomy.

Použitá literatura

- Álvarez-García, V., Tawil, Y., Wise, H. M., & Leslie, N. R. (2019). Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. *Seminars in Cancer Biology*, 59, 66–79. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.02.001>
- An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q. W., & Weiss, W. A. (2018). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFRvIII in glioblastoma (GBM): signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*, 37(12), 1561. <https://doi.org/10.1038/S41388-017-0045-7>
- Arita, H., Narita, Y., Fukushima, S., Tateishi, K., Matsushita, Y., Yoshida, A., Miyakita, Y., Ohno, M., Collins, V. P., Kawahara, N., Shibui, S., & Ichimura, K. (2013). Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathologica*, 126(2), 267–276. <https://doi.org/10.1007/S00401-013-1141-6/FIGURES/4>
- Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., & von Deimling, A. (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica*, 116(6), 597–602. <https://doi.org/10.1007/S00401-008-0455-2/TABLES/3>
- Bieńkowski, M., Wöhrer, A., Moser, P., Kitzwögerer, M., Ricken, G., Ströbel, T., & Hainfellner, J. A. (2018). Molecular diagnostic testing of diffuse gliomas in the real-life setting: A practical approach. *Clinical Neuropathology*, 37(4), 166. <https://doi.org/10.5414/NP301110>
- Bleeker, F. E., Atai, N. A., Lamba, S., Jonker, A., Rijkeboer, D., Bosch, K. S., Tigchelaar, W., Troost, D., Van Dertop, W. P., Bardelli, A., & Van Noorden, C. J. F. (2010). The prognostic IDH1R132 mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta Neuropathologica*, 119(4), 487–494. <https://doi.org/10.1007/S00401-010-0645-6/TABLES/3>
- Brat, D. J., Aldape, K., Colman, H., Figarella-Branger, D., Fuller, G. N., Giannini, C., Holland, E. C., Jenkins, R. B., Kleinschmidt-DeMasters, B., Komori, T., Kros, J. M., Louis, D. N., McLean, C., Perry, A., Reifenberger, G., Sarkar, C., Stupp, R., van den Bent, M. J., von Deimling, A., & Weller, M. (2020). cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathologica*, 139(3), 603–608. <https://doi.org/10.1007/S00401-020-02127-9/TABLES/1>
- Brat, D. J., Cahill, D. P., Cimino, P. J., Huse, J. T., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Komori, T., Reuss, D. E., Suvà, M. L., & von Deimling Weller, M. (2021). Astrocytoma, IDH-mutant. In *Central Nervous System Tumours: WHO Classification of Tumours* (5th ed., Vol. 6, pp. 19–27). International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., Fantin, V. R., Jang, H. G., Jin, S., Keenan, M. C., Marks, K. M., Prins, R. M., Ward, P. S., Yen, K. E., Liao, L. M., Rabinowitz, J. D., Cantley, L. C., Thompson, C. B., vander Heiden,

- M. G., & Su, S. M. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009 462:7274, 462(7274), 739–744. <https://doi.org/10.1038/nature08617>
- Debinski, W. (2021). Preface. *Gliomas*, ix–x. <https://doi.org/10.36255/EXONPUBLICATIONS.GLIOMAS.2021.PREFACE>
- Derks, S., Lentjes, M. H. F. M., Hellebrekers, D. M. E. I., De Bruïne, A. P., Herman, J. G., & Van Engeland, M. (2004). Methylation-specific PCR unraveled. *Cellular Oncology*, 26, 291–299.
- Eskilsson, E., Røsland, G. v., Solecki, G., Wang, Q., Harter, P. N., Graziani, G., Verhaak, R. G. W., Winkler, F., Bjerkvig, R., & Miletic, H. (2018). EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 20(6), 743–752. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOX191>
- Eskilsson, E., Rosland, G. V., Talasila, K. M., Knappskog, S., Keunen, O., Sottoriva, A., Foerster, S., Solecki, G., Taxt, T., Jirik, R., Fritah, S., Harter, P. N., Vålk, K., Al Hossain, J., Joseph, J. V., Jahedi, R., Saed, H. S., Piccirillo, S. G., Spiteri, I., ... Miletic, H. (2016). EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogenous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. *Neuro-Oncology*, 18(12), 1644–1655. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOW113>
- Fadrus, P., Lakomý, R., Hübnerová, P., Slabý, O., Keřkovský, M., Svoboda, T., Vybíhal, V., Neuman, E., Kryštofová, S., Sova, M., & Smrčka, M. (2010). Intrakraniální nádory – diagnostika a terapie. *Interní Medicína pro Praxi*, 12(7 a 8), 376–381. <https://www.solten.cz/pdfs/int/2010/07/10.pdf>
- Features of the SNaPshot® Multiplex System*. (n.d.). Retrieved March 11, 2023, from www.lifetechnologies.com/snapshot.
- Gilbert, M. R., Wang, M., Aldape, K. D., Stupp, R., Hegi, M. E., Jaeckle, K. A., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Won, M., Blumenthal, D. T., Mahajan, A., Schultz, C. J., Erridge, S., Baumert, B., Hopkins, K. I., Tzuk-Shina, T., Brown, P. D., Chakravarti, A., Curran, W. J., & Mehta, M. P. (2013). Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: A randomized phase III clinical trial. *Journal of Clinical Oncology*, 31(32), 4085–4091. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.6968>
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6), 503–512. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8)
- Griffin, C. A., Burger, P., Morsberger, L., Yonescu, R., Swierczynski, S., Weingart, J. D., & Murphy, K. M. (2006). Identification of der(1;19)(q10;p10) in Five Oligodendrogliomas Suggests Mechanism of Concurrent 1p and 19q Loss. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65(10), 988–994. <https://doi.org/10.1097/01.JNEN.0000235122.98052.8F>
- Hartmann, C., Meyer, J., Balss, J., Capper, D., Mueller, W., Christians, A., Felsberg, J., Wolter, M., Mawrin, C., Wick, W., Weller, M., Herold-Mende, C., Unterberg, A.,

- Jeuken, J. W. M., Wesseling, P., Reifenberger, G., & von Deimling, A. (2009). Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: A study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathologica*, *118*(4), 469–474. <https://doi.org/10.1007/S00401-009-0561-9/TABLES/3>
- Hatanpaa, K. J., Burma, S., Zhao, D., & Habib, A. A. (2010). Epidermal Growth Factor Receptor in Glioma: Signal Transduction, Neuropathology, Imaging, and Radioresistance. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *12*(9), 675. <https://doi.org/10.1593/NEO.10688>
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, *352*(10), 997–1003. https://doi.org/10.1056/NEJMOA043331/SUPPL_FILE/997SA1.PDF
- Hendrych M, Valeková H, Kazda T, Lakomý R, Šána J, Jančálek R, Slabý O, & Hermanová M. (2020). Integrovaná diagnostika difúzních gliomů Integrated diagnostics of diffuse gliomas. *Klin Onkol*, *33*(4), 248–259. <https://doi.org/10.14735/amko2020248>
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., & Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands (DNA methylation/tumor suppressor genes/p16/p15). *Medical Sciences*, *93*, 9821–9826.
- Hill, C., Hunter, S. B., & Brat, D. J. (2003). Genetic markers in glioblastoma: prognostic significance and future therapeutic implications. *Advances in Anatomic Pathology*, *10*(4), 212–217. <https://doi.org/10.1097/00125480-200307000-00004>
- Horbinski, C., Mccortney, K., & Stupp, R. (2021). MGMT promoter methylation is associated with patient age and 1p/19q status in IDH-mutant gliomas. *Neuro-Oncology*, *23*(5), 858–860. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAB039>
- Horbinski, C., Miller, C. R., & Perry, A. (2011). Gone FISHing: Clinical Lessons Learned in Brain Tumor Molecular Diagnostics over the Last Decade. *Brain Pathology*, *21*(1), 57. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3639.2010.00453.X>
- Huang, L. E. (2022). Impact of CDKN2A/B Homozygous Deletion on the Prognosis and Biology of IDH-Mutant Glioma. *Biomedicines*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10020246>
- Chow, L. M. L., & Baker, S. J. (2006). PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Letters*, *241*(2), 184–196. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2005.11.042>
- Killela, P. J., Pirozzi, C. J., Healy, P., Reitman, Z. J., Lipp, E., Rasheed, B. A., Yang, R., Diplas, B. H., Wang, Z., Greer, P. K., Zhu, H., Wang, C. Y., Carpenter, A. B., Friedman, H., Friedman, A. H., Keir, S. T., He, J., He, Y., McLendon, R. E., ... Bigner, D. D. (2014). Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct

- subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget*, 5(6), 1515. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.1765>
- Komori, T. (2022). Grading of adult diffuse gliomas according to the 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. *Laboratory Investigation*, 102(2), 126–133. <https://doi.org/10.1038/S41374-021-00667-6>
- Korshunov, A., Sycheva, R., Gorelyshev, S., & Golanov, A. (2005). Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in nonbrainstem glioblastomas of childhood. *Modern Pathology* 2005 18:9, 18(9), 1258–1263. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800415>
- Liu, X. Y., Gerges, N., Korshunov, A., Sabha, N., Khuong-Quang, D. A., Fontebasso, A. M., Fleming, A., Hadjadj, D., Schwartzentruber, J., Majewski, J., Dong, Z., Siegel, P., Albrecht, S., Croul, S., Jones, D. T. W., Kool, M., Tonjes, M., Reifenberger, G., Faury, D., ... Jabado, N. (2012). Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathologica*, 124(5), 615–625. <https://doi.org/10.1007/S00401-012-1031-3/FIGURES/4>
- Lopez-Gines, C., Gil-Benso, R., Ferrer-Luna, R., Benito, R., Serna, E., Gonzalez-Darder, J., Quilis, V., Monleon, D., Celda, B., & Cerdá-Nicolas, M. (2010). New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Modern Pathology*, 23(6), 856–865. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.2010.62>
- Louis, D. N., Aldape, K. D., Capper, D., Giannini, C., Horbinski, C. M., Ng, H. K., Perry, A., Reifenberger, G., Sarkar, C., Soffiatti, R., Suvà, M. L., & Wick, W. (2021). Glioblastoma, IDH-wildtype. In *In Central Nervous System Tumours: WHO Classification of Tumours* (5th ed., Vol. 6, pp. 39–55). International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., Von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAB106>
- Malta, T. M., de Souza, C. F., Sabedot, T. S., Silva, T. C., Mosella, M. S., Kalkanis, S. N., Snyder, J., Castro, A. V. B., & Nounshmehr, H. (2018). Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP): biological and clinical implications. *Neuro-Oncology*, 20(5), 608. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOX183>
- Marker, D. F., Agnihotri, S., Amankulor, N., Murdoch, G. H., & Pearce, T. M. (2022). The dominant TP53 hotspot mutation in IDH-mutant astrocytoma, R273C, has distinctive pathologic features and sex-specific prognostic implications. *Neuro-Oncology Advances*, 4(1). <https://doi.org/10.1093/NOAJNL/VDAB182>

- Melhem, J. M., Detsky, J., Lim-Fat, M. J., & Perry, J. R. (2022). Updates in IDH-Wildtype Glioblastoma. *Neurotherapeutics* 2022 19:6, 19(6), 1705–1723. <https://doi.org/10.1007/S13311-022-01251-6>
- Mizoguchi, M., Betensky, R. A., Batchelor, T. T., Bernay, D. C., Louis, D. N., & Nutt, C. L. (2006). Activation of STAT3, MAPK, and AKT in Malignant Astrocytic Gliomas: Correlation With EGFR Status, Tumor Grade, and Survival. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65(12), 1181–1188. <https://doi.org/10.1097/01.JNEN.0000248549.14962.B2>
- Molenaar, R. J., Verbaan, D., Lamba, S., Zanon, C., Jeuken, J. W. M., Boots-Sprenger, S. H. E., Wesseling, P., Hulsebos, T. J. M., Troost, D., Van Tilborg, A. A., Leenstra, S., Vandertop, W. P., Bardelli, A., Van Noorden, C. J. F., & Bleeker, F. E. (2014). The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro-Oncology*, 16(9), 1263–1273. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOU005>
- Mosrati, M. A., Malmström, A., Lysiak, M., Krysztofiak, A., Hallbeck, M., Milos, P., Hallbeck, A.-L., Bratthäll, C., Strandéus, M., Stenmark-Askalm, M., Söderkvist, P., Mosrati, M. A., Malmström, A., Lysiak, M., Krysztofiak, A., Hallbeck, M., Milos, P., Hallbeck, A.-L., Bratthäll, C., ... Söderkvist, P. (2015). TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget*, 6(18), 16663–16673. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.4389>
- Normanno, N., de Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., Carotenuto, A., de Feo, G., Caponigro, F., & Salomon, D. S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366(1), 2–16. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2005.10.018>
- Ohgaki, H. (2005). Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*, 25(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1789.2004.00600.X>
- Okada, Y., Hurwitz, E. E., Esposito, J. M., Brower, M. A., Nutt, C. L., & Louis, D. N. (2003). Selection Pressures of TP53 Mutation and Microenvironmental Location Influence Epidermal Growth Factor Receptor Gene Amplification in Human Glioblastomas. *CANCER RESEARCH*, 63, 413–416. <http://genomics.roswellpark.org/human/overview.html>.
- Olson, R. A., Brastianos, P. K., & Palma, D. A. (2011). Prognostic and predictive value of epigenetic silencing of MGMT in patients with high grade gliomas: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neuro-Oncology*, 105(2), 325–335. <https://doi.org/10.1007/S11060-011-0594-5/FIGURES/3>
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). Editor’s choice: The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncology*, 16(7), 896. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOU087>

- Ostrom, Q. T., Price, M., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K. A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2022). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019. *Neuro-Oncology*, *24*(Supplement_5), v1–v95. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAC202>
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C. H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., ... Kinzler, K. W. (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5897), 1807. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1164382>
- Reifenberger, G., Cairncross, J. G., Figarella-Branger, D., Hartmann, C., Kros, J. M. L., Louis, D. N., Snuderl, M., Suvà, M. L., Van Den Bent, M. J., Yip, S., & Yokoo, H. (2021). Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted. In *Central Nervous System Tumours: WHO Classification of Tumours* (5th ed., Vol. 6, pp. 28–38). International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Reitman, Z. J., Pirozzi, C. J., & Yan, H. (2013). Promoting a new brain tumor mutation: TERT promoter mutations in CNS tumors. *Acta Neuropathologica*, *126*(6), 789–792. <https://doi.org/10.1007/S00401-013-1207-5/FIGURES/1>
- Riemenschneider, M. J., Hegi, M. E., & Reifenberger, G. (2010). MGMT promoter methylation in malignant gliomas. *Targeted Oncology*, *5*(3), 161–165. <https://doi.org/10.1007/S11523-010-0153-6/FIGURES/1>
- Riemenschneider, M. J., Jeuken, J. W. M., Wesseling, P., & Reifenberger, G. (2010). Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathologica*, *120*(5), 567. <https://doi.org/10.1007/S00401-010-0736-4>
- Schneider, T., Mawrin, C., Scherlach, C., Skalej, M., & Firsching, R. (2010). Die gliome des erwachsenen. *Deutsches Arzteblatt*, *107*(45), 799–808. <https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.2010.0799>
- Śledzińska, P., Bebyn, M. G., Furtak, J., Kowalewski, J., & Lewandowska, M. A. (2021). Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19). <https://doi.org/10.3390/IJMS221910373>
- Śledzińska, P., Bebyn, M., Szczerba, E., Furtak, J., Harat, M., Olszewska, N., Kamińska, K., Kowalewski, J., & Lewandowska, M. A. (2022). Glioma 2021 WHO Classification: The Superiority of NGS Over IHC in Routine Diagnostics. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/S40291-022-00612-3/FIGURES/8>
- Smith, J. S., Tachibana, I., Passe, S. M., Huntley, B. K., Borell, T. J., Iturria, N., O'Fallon, J. R., Schaefer, P. L., Scheithauer, B. W., James, C. D., Buckner, J. C., & Jenkins, R. B. (2001). PTEN Mutation, EGFR Amplification, and Outcome in Patients With Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *93*(16), 1246–1256. <https://doi.org/10.1093/JNCI/93.16.1246>

- Smrčka, M., Belanová, R., Fadrus, P., Hermanová, M., Kazda, T., Keřkovský, M., Lakomý, M., Netuka, D., Neuman, E., Slabý, O., Šána, J., Šlampa, P., Šprlákova-Puková, A., Kantorová, L., Klugar, M., & Pokorná, A. (2016). *Projekt: Klinické doporučené postupy Gliomy mozku-diagnostika a léčba Klinický souhrn Adolopment doporučený postup (NICE: Brain tumours (primary) and brain metastases in adults, CAP: Diagnostic Testing for Diffuse Gliomas)*. <https://kdp.uzis.cz/res/guideline/42-gliomy-mozku-diagnostika-lecba-final.pdf>
- Stichel, D., Ebrahimi, A., Reuss, D., Schrimpf, D., Ono, T., Shirahata, M., Reifenberger, G., Weller, M., Hänggi, D., Wick, W., Herold-Mende, C., Westphal, M., Brandner, S., Pfister, S. M., Capper, D., Sahm, F., & von Deimling, A. (2018). Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathologica*, *136*(5), 793–803. <https://doi.org/10.1007/S00401-018-1905-0/TABLES/2>
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *23*(10), 1985–1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275/68016/AM/EPIDEMIOLOGIC-AND-MOLECULAR-PROGNOSTIC-REVIEW-OF>
- Urbanovska, I., Megova, M. H., Dwight, Z., Kalita, O., Uvirova, M., Simova, J., Tuckova, L., Buzrla, P., Palecek, T., Hajduch, M., Dvorackova, J., & Drabek, J. (2019). IDH Mutation Analysis in Glioma Patients by CADMA Compared with SNaPshot Assay and two Immunohistochemical Methods. *Pathology and Oncology Research*, *25*(3), 971–978. <https://doi.org/10.1007/S12253-018-0413-9/TABLES/1>
- Vogt, N., Lefèvre, S. H., Apiou, F., Dutrillaux, A. M., Cör, A., Leuraud, P., Poupon, M. F., Dutrillaux, B., Debatisse, M., & Malfoy, B. (2004). Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(31), 11368–11373. https://doi.org/10.1073/PNAS.0402979101/SUPPL_FILE/02979TABLE3.HTML
- Waitkus, M. S., Diplas, B. H., Yan, H., Preston, T., Tisch, R., & Tumor, B. (2016). Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro-Oncology*, *18*(1), 16–26. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOV136>
- Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (2009). IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas. *The American Journal of Pathology*, *174*(4), 1149–1153. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2009.080958>
- Weyerer, V., Eckstein, M., Strissel, P. L., Wullweber, A., Lange, F., Tögel, L., Geppert, C. I., Sikic, D., Taubert, H., Wach, S., Wullich, B., Hartmann, A., Stoehr, R., & Giedl, J. (2021). TERT Promoter Mutation Analysis of Whole-Organ Mapping Bladder Cancers. *Genes*, *12*(2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/GENES12020230>

- Whitfield, B. T., & Huse, J. T. (2022). Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathology*, 32(4). <https://doi.org/10.1111/BPA.13062>
- Yang, K., Wu, Z., Zhang, H., Zhang, N., Wu, W., Wang, Z., Dai, Z., Zhang, X., Zhang, L., Peng, Y., Ye, W., Zeng, W., Liu, Z., & Cheng, Q. (2022). Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches. *Molecular Cancer* 2022 21:1, 21(1), 1–32. <https://doi.org/10.1186/S12943-022-01513-Z>
- Yuan, Y., Qi, C., Maling, G., Xiang, W., Yanhui, L., Ruofei, L., Yunhe, M., Jiewen, L., & Qing, M. (2016). TERT mutation in glioma: Frequency, prognosis and risk. *Journal of Clinical Neuroscience*, 26, 57–62. <https://doi.org/10.1016/J.JOCN.2015.05.066>