

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta



Molekulárně cytogenetické změny u nádorů CNS

DOKTORSKÁ DIZERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Zuzana Šporiková

Olomouc 2021

Doktorand:	Mgr. Zuzana Šporiková
Doktorský studijní program:	Pediatric
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc Hněvotínská 5 Olomouc
Školitel:	Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a uvedla jsem veškerou použitou literaturu, ze které jsem čerpala. Práce byla realizována pod odborným dohledem školitele, RNDr. Radka Trojance Ph.D., MBA, a byla podporována granty: Ministerstva zdravotnictví České republiky [NV19-04-00281 a NU21-03-00195], BBMRI-CZ [LM2018125], Univerzity Palackého [IGA LF_2020_007], Technology Agency of the Czech Republic [TE02000058] a the European Regional Development Fund - Project ENOCH [CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868], Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR [grant LM2018132].

Poděkování

Děkuji mým školitelům RNDr. Radku Trojancovi, Ph.D., MBA a Mgr. Vladimíře Koudelákové, Ph.D. za zaštitění celkové práce na Ústavu molekulární a translační medicíny. Mé poděkování patří obzvláště doc. MUDr. Ondřeji Kalitovi, Ph.D. MBA za pomoc při publikacích a za jeho vzácný čas, Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D. bych chtěla poděkovat za statistickou analýzu dat pro publikaci. Mé poděkování také patří doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. za odborné vedení projektů a v neposlední řadě i celému týmu spolupracovníků ÚMTM.

Obrovský dík patří i celé podporující rodině.

V Olomouci,
Mgr. Zuzana Šporiková

1. Obsah

1. Obsah.....	5
1. Teoretická část	8
1.1. Gliální nádory (gliomy)	8
1.2. Diagnostika a standardní terapie gliálních nádorů.....	10
1.2.1. Zobrazovací metody	10
1.2.2. Resekce nádoru	10
1.2.3. Standardní terapie.....	11
1.2.4. Experimentální terapie	12
1.2.5. Souhrn kapitoly.....	13
1.3. Klasifikace gliomů	15
1.3.1. Klasifikace gliomů dle WHO 2007.....	15
1.3.2. Klasifikace gliomů s doplněním z roku 2016	15
1.3.2.1. Difúzní astrocytární a oligodendroglální nádory	16
Difúzní astrocytom	17
Anaplastický astrocytom	17
Glioblastom	18
Difúzní středočárový gliom <i>H3K27M</i> mutovaný.....	18
Oligodendrogliom.....	18
Anaplastický oligodendrogliom	19
Oligoastrocytom	19
Anaplastický oligoastrocytom	19
1.3.2.2. Ostatní astrocytární nádory.....	19
1.3.2.3. Ependymální nádory.....	20
1.3.3. Souhrn kapitoly.....	20
1.4. Molekulárně cytogenetické změny u gliomů	21
1.4.1. Hereditární nádorové syndromy spojené s výskytem gliomů	21
1.4.2. Rizikové faktory	21
1.4.3. Získané molekulárně cytogenetické změny u gliomů.....	22
1.4.3.1. Mutace genu <i>IDH</i>	22
1.4.3.2. Metylace <i>MGMT</i>	24
1.4.3.3. Mutace genu <i>EGFR</i>	24
1.4.3.4. Kodelece chromozomálních ramen 1p/19q	25

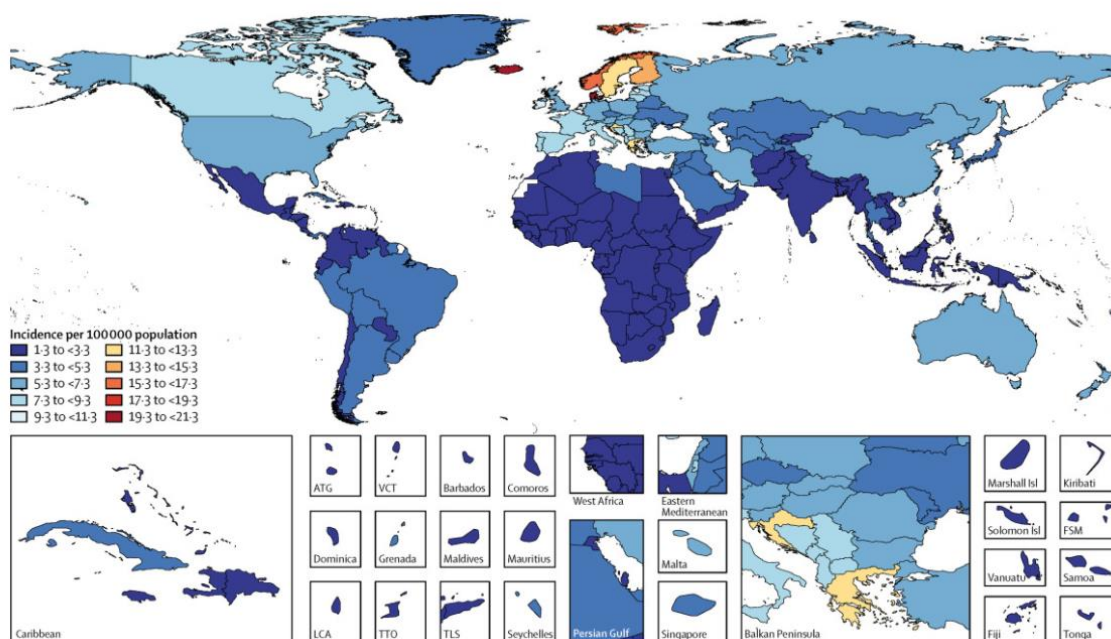
1.4.3.5.	Mutace genu <i>TERT</i>	25
1.4.3.6.	Mutace genu <i>ATRX</i>	26
1.4.3.7.	Mutace genu <i>TP53</i>	26
1.4.3.8.	Mutace genu <i>MDM2</i>	27
1.4.3.9.	Mutace genu <i>PTEN</i>	27
1.4.3.10.	Mutace genu <i>CDKN2A</i>	28
1.4.3.11.	Mutace genu <i>CCND1</i>	28
1.4.3.12.	Mutace <i>H3K27M</i>	29
1.4.3.13.	Další aberace	29
1.4.4.	Cílená léčba	30
1.4.5.	Souhrn kapitoly	30
2.	Experimentální část	32
2.1.	Cíle práce	32
2.2.	Mutace <i>IDH1/2</i> u českých pacientů s difuzním gliomem: retrospektivní masivně paralelní analýza z jednoho centra	33
2.2.1.	Úvod	33
2.2.2.	Materiál a metodika	34
2.2.3.	Výsledky	36
2.2.3.1.	Imunohistochemie	36
2.2.3.2.	FISH	37
2.2.3.3.	Sekvenování IHC <i>IDH1</i> wild type pacientů mladších 55 let	37
2.2.3.4.	Kontrola kvality sekvenovacích metod	37
2.2.4.	Diskuze	39
2.2.5.	Závěr	40
2.2.6.	Podíl autora dizertační práce na daném tématu	41
2.3.	Vliv genových aberací na přežití u pacientů s resekovaným glioblastomem <i>IDH</i> wild type z jednoho centra	42
2.3.1.	Úvod	42
2.3.2.	Materiál a metodika	42
2.3.2.1.	Pacienti	42
2.3.2.2.	Imunohistochemické stanovení statusu <i>IDH1</i> R132H	43
2.3.2.3.	Imunohistochemické vyšetření statusu <i>Ki67</i>	43
2.3.2.4.	Genotypizace <i>IDH1</i> R132 a <i>IDH2</i> R172	44
2.3.2.5.	FISH analýza	44
2.3.2.6.	Nastavení cut off hodnot počtu kopií	44

2.3.2.7.	MGMT metylační status	45
2.3.2.8.	Statistická analýza	45
2.3.3.	Výsledky.....	45
2.3.3.1.	Základní charakteristika pacientů.....	45
2.3.3.2.	Pacienti GBM <i>IDH</i> wild type léčení chemoradioterapií	47
2.3.3.3.	Pacienti GBM <i>IDH</i> wild type léčení radioterapií	47
2.3.3.4.	Pacienti GBM <i>IDH</i> wt bez terapie	48
2.3.3.5.	Statistická data celé kohorty GBM <i>IDH</i> wt	48
2.3.3.6.	Shrnutí výsledků	52
2.3.4.	Diskuze.....	52
2.3.5.	Závěr	54
2.3.6.	Podíl autora dizertační práce na daném tématu.....	54
3.	Souhrn	55
4.	Summary.....	56
5.	Seznam obrázků a tabulek.....	57
6.	Seznam zkratk.....	59
7.	Seznam literatury	61
8.	Seznam publikací autora	78
8.1.	Původní a přehledové práce.....	78
8.2.	Prvoautorské přednášky a postery přednesené na odborných fórech	78
9.	Přílohy	81

1. Teoretická část

1.1. Gliální nádory (gliomy)

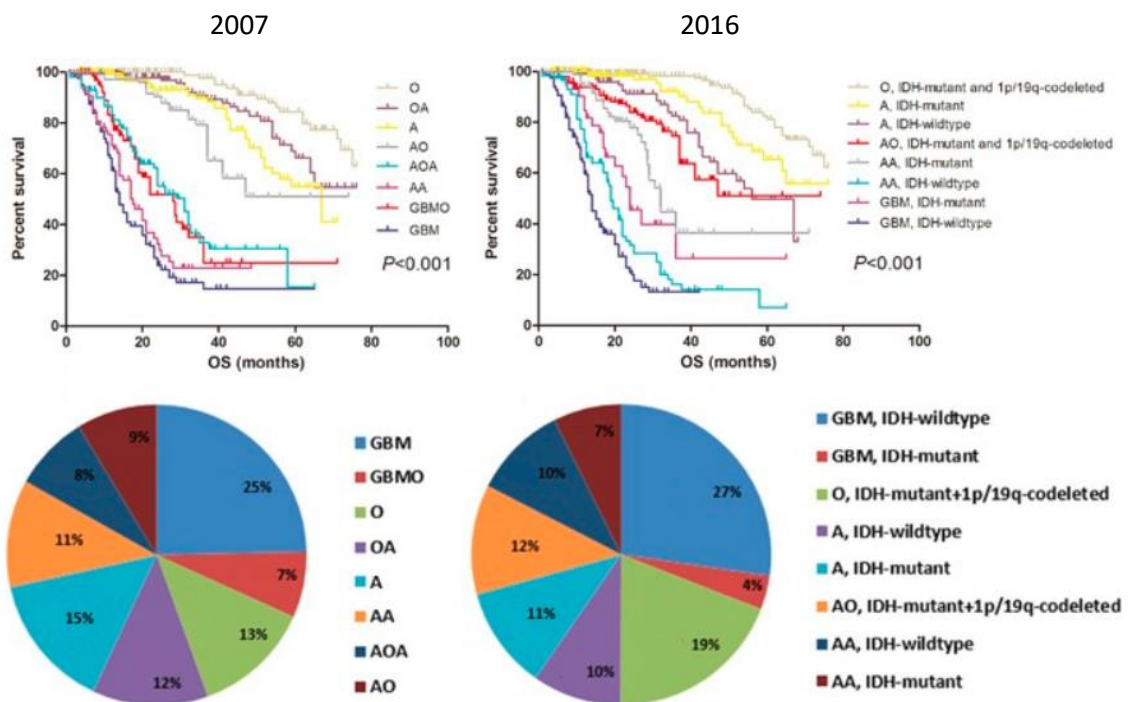
Gliální nádory jsou nejčastější primární nádory mozku u dospělých vykazující vysokou malignitu a agresivitu. Ačkoli jsou relativně vzácné, jsou charakterizovány vysokou mortalitou a morbiditou. Tyto nádory jsou odvozeny z neurogliálních buněk nebo jejich progenitorů¹. Incidence gliomů se v jednotlivých studiích různí v závislosti na histologickém subtypu, věku v době diagnózy, pohlaví, rase i na geografické poloze². Incidence tohoto onemocnění je graficky zobrazena v Obrázku 1, celosvětově je přibližně 5 diagnostikovaných na 100 000 obyvatel a všeobecně se gliomy častěji vyskytují u mužů než u žen³. Napříč všemi nádory mozku, tvoří gliální nádory 60 % těchto nádorů⁴. V České republice byla incidence v roce 2018 rovna osmi případům a mortalita rovna hodnotě přes šest úmrtí na 100 000 obyvatel, kdy tato čísla mají od roku 1977 vzrůstající charakter⁵. Bohužel nejčastějším podtypem primárního nádoru mozku je glioblastom gradu IV a i přes maximální radikalitu léčby je spojován se špatnou prognózou a přežitím zřídka kdy přesahujícím 2 roky⁶. Naproti tomu low grade gliomy se řadí mezi benigní nádory s relativně dobrou prognózou.



Obrázek 1: Celosvětová incidence nádorů CNS v přepočtu na 100 000 obyvatel. Převzato z originálu³.

Díky pokroku molekulární medicíny byla na základě rozvoje sekvenování a genomických studií vytipovány markery napříč širokým spektrem nádorových onemocnění. Mezi prvními biomarkery v oblasti gliálních nádorů byly nalezeny metylace pro O6-methylguanin-DNA-methyltransferázu (*MGMT*), mutace genu pro isocitrát dehydrogenázu 1/2 (*IDH1/2*), kodelce chromozomálních oblastí 1p/19q a amplifikace genu pro receptor epidermálního růstového faktoru 1 (*EGFR1*)⁷⁻¹¹. V roce 2016 vyšla aktualizace Světové zdravotnické organizace týkající se klasifikace gliálních nádorů a do charakterizačního algoritmu a terminologie byly zapojeny další významné molekulární markery¹².

Před aktualizací z roku 2016, byl klasifikační systém založen pouze na faktorech pozorovaných mikroskopem. I přesto, že molekulárně genetické charakteristiky pouze doplňují již zavedené histologické definice, jedná se o značný posun ve vnímání tohoto nádorového onemocnění a kombinací dostupných informací lze přesněji specifikovat prognózu i predikovat odpověď na léčbu. Obrázek 2 ilustruje posun v diagnóze difuzních a oligodendroglálních nádorů spolu s jeho vlivem na délku doby přežití dle doporučených změn z WHO 2007 na WHO 2016.



Obrázek 2: Míra přežití a distribuce jednotlivých difuzních nádorů dle doporučení WHO 2007 a aktualizace těchto dat dle WHO 2016. Převzato z originálu¹³.

GBM – glioblastom, GBMO – glioblastom s oligodendroglální komponentou, O – oligodendrogliom, A – astrocytom, AA – anaplastický astrocytom, AOA – anaplastický oligoastrocytom, AO – anaplastický oligodendrogliom.

1.2. Diagnostika a standardní terapie gliálních nádorů

Příznaky gliálního onemocnění mohou být pozorovatelné pouze týdny od diagnózy nebo dokonce i roky. Pacient může pociťovat nespecifické symptomy (epileptické záchvaty, bolest hlavy, únava, kognitivní poruchy), což je dané dynamikou růstu jednotlivých druhů nádorů¹⁴. V první řadě je pacient podroben vyšetření k rozlišení primárního nádoru od metastáz v mozku, zjištění možných kontraindikací neurochirurgického zákroku a také neurologickému vyšetření¹⁵. Preoperační diagnostika zahrnuje zejména využití technik zobrazovacích metod.

1.2.1. Zobrazovací metody

V současnosti se při suspekci na nádor mozku nejčastěji využívá počítačová tomografie (CT), která má schopnost odhalit nádor, avšak její použití se doporučuje pouze při prvních akutních příznacích. Základní zobrazovací technikou v neurologii a neurochirurgii je morfologická magnetická rezonance (MRI). Tato technika je schopna poskytnout detailní náhled do mozku, míchy, cév a to ve třech rovinách. S pomocí kontrastních látek lze předběžně stanovit i přesnější diagnózu, kdy dochází ke specifickému syčení kontrastní látky v místě nádoru. Kromě těchto informací, poskytuje vyšetření i další nálezy jakými jsou vaskularizace, kalcifikace, nekrózy aj. Pro preoperační vyšetření lze dále využít funkční magnetickou rezonanci (fMRI), která umožňuje zobrazení aktivních oblastí mozku na základě sledování změn oxygenace krve¹⁶.

Další hojně využívanou zobrazovací technikou je pozitronová emisní tomografie (PET), kdy je hlavní výhodou umožnění zobrazení fyziologických a patologických procesů probíhajících v organismu za použití aminokyselin značených radionuklidy. Často je tato metoda kombinována s rentgenovou výpočetní tomografií označovanou jako PET-CT¹⁷.

1.2.2. Resekce nádoru

Před samotnou resekci nádoru dochází nejčastěji ke stereotaktické biopsii, kdy je odebrán histologický vzorek pro zpřesnění diagnózy. Tato metoda je charakterizována nízkým rizikem morbidit a vysokou mírou přesnosti¹⁸.

U glioblastomu jakožto gliomu s nejvyšší incidencí a mediánem doby přežití pouze okolo 15 měsíců, je přístupováno vždy k maximálnímu možnému odstranění tohoto nádoru. Gliální nádory gradu II a III časem progredují, je tedy nasnadě využití maximální možné léčebné terapie založené na resekci nádoru i v těchto případech.

Bohužel jak už název skupiny naznačuje, jedná se o difuzní nádory s možnými diseminacními lézemi vyskytujícími se dokonce až v protější hemisféře¹⁹. Je dokázáno, že při odstranění více jak 98 % glioblastomu, dochází ke značnému prodloužení života pacienta^{20,21}. Tento efekt je zdokumentován i u low grade tumorů, kdy pacienti mají benefit z oddálení anaplastické transformace a je tak dosaženo prodloužení celkového přežití²². Důkazem tohoto efektu je prodloužení doby přežití bez progresu a

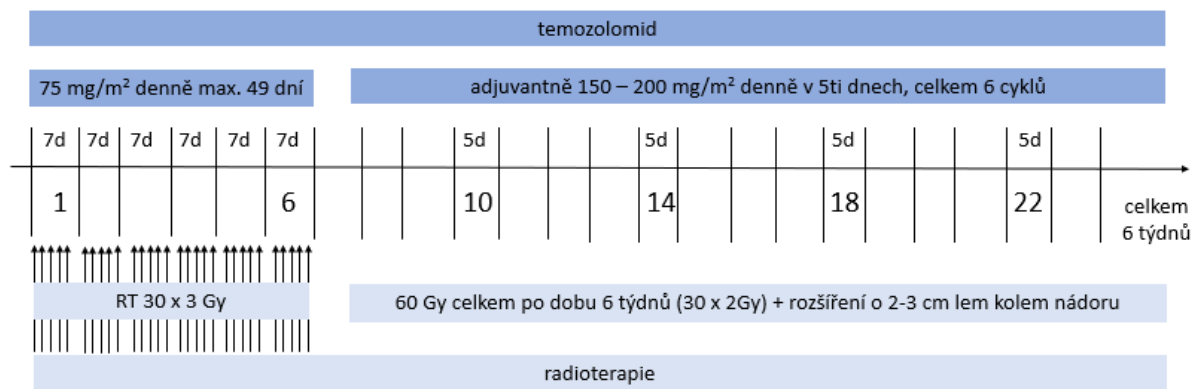
celkového přežití. Měřítkem outcome pacienta může být i rozsah resekce, čímž se uvažuje přímá úměra mezi zbytkovým objemem nádoru a délkou přežití pacienta²⁰.

Maximální míra resekce nádoru je prakticky odvozena od možností rozlišení zobrazovacích metod. Avšak i přes použití metod jako je FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) zobrazování, ultrazvukově vedené resekce a použití 5-aminolevulinové kyseliny kumulující se v nádorových buňkách, nedošlo ke zlepšení celkového přežití ani přežití bez progresu²³. Na druhé straně, studie zaměřené na tzv. supratotální resekci u low grade gliomů prokázaly, že agresivní resekce s kontrolou funkčních částí mozku pomocí elektrostimulace prodloužilo celkového přežití i přežití bez progresu²⁴⁻²⁶. U supratotální resekce se však musí počítat s rizikem ztráty neurologických a motorických funkcí, jazykové dysfunkce a zhoršením kognitivních funkcí²⁷.

1.2.3. Standardní terapie

U high grade gliomů se přistupuje po resekci k adjuvantní radioterapii, kdy se cílí na diseminované buňky zbytkového nádoru. Nejedná se však o léčbu jako takovou, efektem je zlepšení přežití v porovnání se samotnou resekci nebo jen se samotným ozařováním²⁸. V současné době se jedná o standardní léčebný režim v doporučených dávkách 50 – 60 Gy zahrnující lem v šíři 2 cm okolo lokalizace nádoru. Důvodem rozšíření oblasti ozařování je zdokumentovaná vysoká pravděpodobnost rekurence nádoru čítající až 90 %²⁹. Nejvhodnější dávka 60 Gy bývá nejčastěji rozdělena po 2 Gy do 30 dávek³⁰. U low grade gliomů není efekt radioterapie natolik markantní. Efekt ranné radioterapie následované po resekci zlepšuje u low grade gliomů přežití bez nemoci/přežití bez progresu, avšak nebyl prokázán efekt na celkové přežití pacientů³¹.

Počátky chemoterapie používané v léčbě gliomů se datují okolo 70. let 20. století, kdy byly první klinické testy prováděny s nitrosureou, přesněji carmustinem a semustinem, kdy v kombinaci s radioterapií měli benefit především pacienti s anaplastickým astrocytome³². V roce 1999 byl FDA (Federal Drug Administration) schválen temozolomid jakožto alkylační činidlo. Ten byl nejdříve indikován u rekurentního glioblastomu a později i určen pro léčbu primárního glioblastomu. V současné době je zahrnut do standardního léčebného režimu u nově diagnostikovaných maligních gliomů hlavně díky tzv. Stuppovu režimu³³. Tento režim spočívá v pooperační konkomitantní chemoradioterapii temozolomidem následovaný podáním adjuvantní chemoterapie v délce šesti měsíců (Obrázek 3). Relativní riziko smrti u maligních gliomů se tímto režimem snižuje o 37 % a dvouleté přežití bylo u těchto pacientů zlepšeno o 16 % v porovnání s pacienty léčenými pouze radioterapií. Navíc dochází k redukci vedlejších účinků a pacienti tuto léčbu lépe tolerují v porovnání s jinými chemoterapeutickými režimy.



Obrázek 3: Schéma Stuppova protokolu založeného na konkomitantní chemoradioterapii³³.

Co se týče low grade gliomů a léčby chemoradioterapií, není tato oblast úplně jednoznačná. Léčba by měla být rozhodována na základě prognostických faktorů jako jsou věk, neurologické deficity, astrocytární původ, molekulární status, rychlost růstu nádoru a patologický neurokognitivní status³⁴. Doporučovaná léčba low grade gliomů pomocí chemoradioterapie je založena na kombinaci procarbazonu, lomustinu a vincristinu, avšak klinická praxe často využívá léčby pomocí temodal^{34,35}.

Existují však případy, kdy pacienti nemohou být vzhledem ke svému stavu léčeni standardní terapeutickou cestou. Jedná se většinou o pacienty s vysokým počtem komorbidit, velkými lézemi, rychlým zhoršením stavu odpovídajícím glioblastomu s velmi špatnou prognózou. U těchto pacientů se nedoporučuje ani biopsie pro získání vzorku gliomu a přistupuje se přímo k paliativní léčbě.

1.2.4. Experimentální terapie

Stuppův protokol chemoradioterapeutického režimu spojený s resekcí měl průlomový dopad na léčbu maligních gliálních nádorů. Bohužel se jedná o jeden z mála experimentálních přístupů se slibnými výsledky, který byl nakonec zapojen do standardního léčebného režimu. Problémem administrace chemoterapeutik je hematoencefalická bariéra, která limituje přístup léčiv přímo k nádorovým buňkám. Temozolomid je právě jedním z mála látek, které tuto bariéru úspěšně prostupují.

Léčba jednoho z nejzákeřnějších nádorových onemocnění je stále výzvou. Nové léčebné režimy proto hledají směry, jakými tento nádor inovativně léčit jsou následující: cílený přenos terapeutik do míst nádorových buněk, strategie jak terapeutikum přenést skrz hematoencefalickou bariéru, inovativní radioterapií se selekcí pouze na nádorové buňky, techniky na lokální rozrušení nádoru, inhibitory růstu nádoru, imunoterapie a buněčná/genová terapie. V současné době jsou prováděny experimentální studie (Tabulka 1) zaměřené na pokročilé terapeutické přístupy u glioblastomu, které mají za cíl se selektivně zaměřit pouze na nádorové buňky a nepoškodit tak mozkovou tkáň³⁶.

Tabulka 1: Projekty experimentální léčby GBM, shrnuto podle³⁶.

inovace při administraci protinádorových léčiv	inovace v radioterapii
intraoperativní implantáty s PT pro rezidua nádoru magnetické kationtové mikrokuličky jako nosič	terapie zachycenými boronovými neutrony brachyterapie: implantace zrnka emitujícího radiaci v nádoru

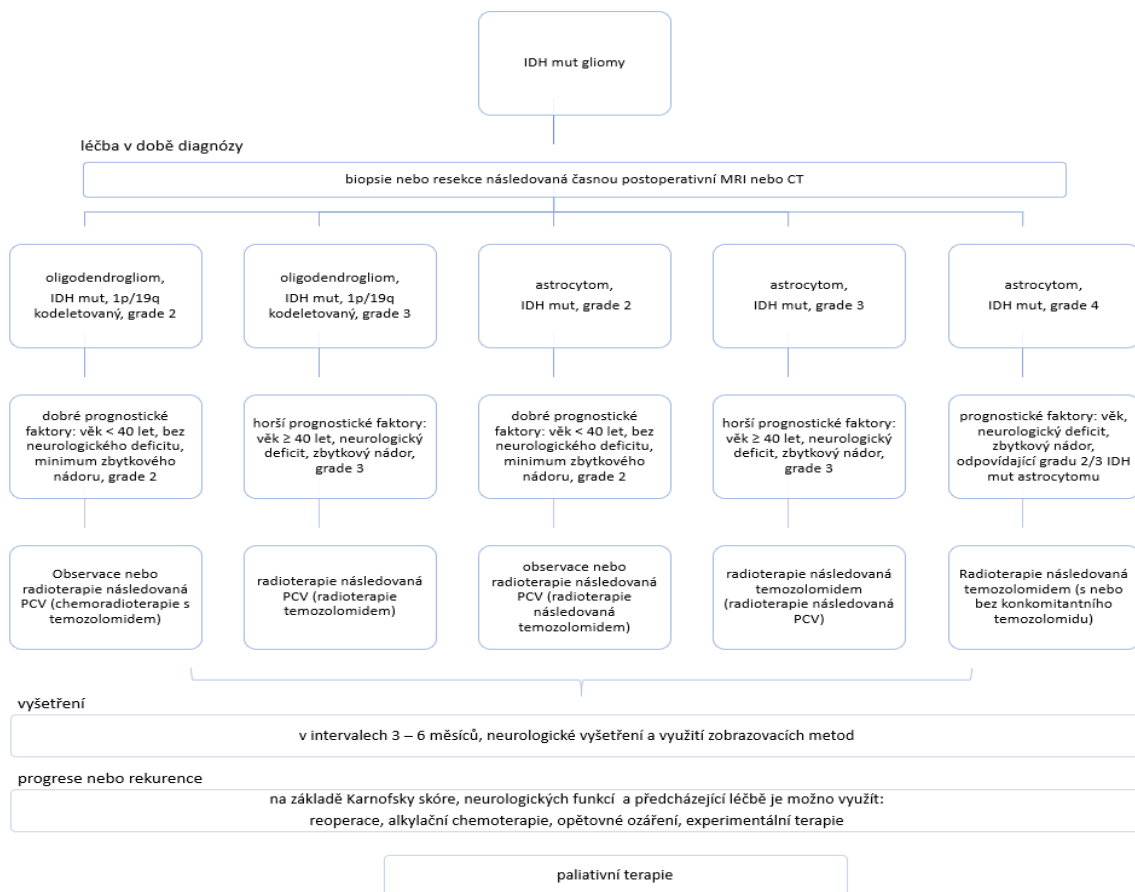
stereotaktické vložení mikrokuliček s PT mikrobulinky s lipidovou vrstvou jako nosič	zvýšení efektu radioterapie pomocí hyperbarického kyslíku radiooperace: zvýšení efektu ionizujícího záření
strategie pro překonání hematoencefalické bariéry	chemoterapeutická senzitivace
intraarteriální chemoterapie přenos léčiv pomocí nanotechnologií	hyperbarický kyslík fotodynamická terapie pro chemosenzitivaci
inhibice nádorového růstu	imunitní terapie
blokáce tyrozinkináz telomerázová inhibice antiangiogenní terapie intramuskulární podávání systémové podávání thalidomidu cílení drah epidermálního růstového faktoru	vakcinace nádory mozku blokáce imunitních checkpointů monoklonální protilátky radioaktivně značené Ag injektované přímo do nádoru rekombinantní IL-2 a lymfokinem aktivované NK buňky rekombinantní imunotoxiny cílící na EGF
lokální destrukce nádoru	genová terapie
geneticky modifikované bakterie způsobující lýzi NB hypertermie injekce fúzního toxinu s interleukinem-4 intraoperativní fotodynamická terapie onkolýze geneticky modifikovanými organizmy	apoptózu indukující FADD/MORT1 genový přenos deoxycytidin cDNA pro cytotoxický efekt cytosin arabinosidu intratumorální injekce geneticky modif. neurotrofických virů <i>gpt</i> gen z <i>E. coli</i> pro senzitivizaci na látku 6-thioxantin vložení genů způsobující senzitivitu na léčiva "sebevražedná" genová terapie: tymidin kináza z HSV virové vektory obsahující radiaci inducibilní promotory
buněčná terapie	genová suprese
CAR-T buněčná terapie enkapsulované buňky produkující PT terapie gliomovými kmenovými buňkami přeměna kmenových buněk (IL-4) s produkcí PT	antisense vlákno RNAi

PT – protinádorová terapeutika; NB – nádorové buňky; Ag – protilátky; EGF – epidermální růstový faktor; IL-2 – interleukin-2; HSV – *herpes simplex virus*.

1.2.5. Souhrn kapitoly

Klasifikace nádorů CNS prošla změnami v roce 2016 a z tohoto důvodu byly upraveny i doporučení pro léčbu pacientů s gliomy reflektující vliv molekulárních markerů³⁷. S ohledem na terapii byly shrnuty výsledky klinického výzkumu zahrnujícího různé léčebné modalitivy resekce, radioterapie a systémové farmakoterapie.

Léčba je všeobecně založena na základním rozdělení ne/přítomnosti mutace *IDH* a rozlišení dle histologie po biopsii nádoru, gradu, klinických faktorech jako je Karnofského skóre a věk, zbytková masa nádoru. Na základě těchto faktorů je rozhodnuto o léčbě následovanou kontrolami v rozmezí 2 až 6 měsíců. Všeobecně se dá říci, že *IDH* mutované gliomy gradu 2 a 3 jsou léčeny kombinací radioterapie s PCV (prokarbazinu, lomustinu a vinkristinu) popřípadě chemoradioterapie s temozolomidem (Obrázek 4). V případě gradu u 4 je léčba založena na samotné radioterapii nebo chemoradioterapii temozolomidem (obrázek 5).



Obrázek 4: Klinický postup léčby IDH mutovaných difuzních gliomů u dospělých. Upraveno dle ³⁷.
PCV – procarbazin, lomustin, vinkristin.



Obrázek 5: Klinický postup léčby IDH wild type difuzních gliomů u dospělých. Upraveno dle ³⁷.
KS – Karnofského skóre, MGMT - O6-methylguanin-DNA-methyltransferáza.

1.3. Klasifikace gliomů

Na základě potřeby sjednotit mezinárodně klasifikaci nádorů centrální nervové soustavy (CNS), bylo v roce 1979 vydáno první vydání Histologické typizace nádorů vydané Světovou zdravotnickou organizací (WHO) a na ni v následujících letech navázaly další tři edice a jedno doplnění z roku 2016.

První edice z roku 1979 byla založena na pěti skupinách (0-IV) založených na prognóze bez ohledu na histologii a cytologii³⁸. V následných edicích už byly do klasifikace zahrnuty i klinickohistologické znaky a značení gradu jako I-IV, vaskulární proliferace, strukturální abnormality, mitózy a nekrózy. Postupný vývoj klasifikace reflektuje vývoj nových technologií v oblasti molekulární diagnostiky od světelné mikroskopie s imunohistochemií přes fluorescenční *in situ* hybridizaci až po sekvenování.

1.3.1. Klasifikace gliomů dle WHO 2007

Poslední kompletní klasifikace nádorů CNS byla uvedena v roce 2007 Světovou zdravotnickou organizací, která rozšířila seznam o další histologické varianty na základě různých se klinickopatologických charakteristik. Oproti předchozí edici byl kladen důraz na epidemiologii, klinické charakteristiky a symptomy, zobrazovací metody, prognostické a prediktivní faktory. Tato čtvrtá edice je založena na rozdělení gliálních nádorů dle histopatologických kritérií a gradu v rozmezí I až IV, které predikuje biologické chování nádoru. Grade I označuje nádory s nízkou proliferací a dobrou prognózou, naproti tomu gliální nádory gradu IV jsou maligní a pacienti s tímto typem nádoru mají krátkou dobu přežití. Všeobecně grade gliálních nádorů kombinuje predikci odpovědi na terapii a samotný outcome pacienta.

1.3.2. Klasifikace gliomů s doplněním z roku 2016

Poprvé za dobu vzniku mezinárodní klasifikace nádorů CNS byly využity molekulární parametry, které spolu s histologií pomohly lépe definovat jednotlivé nádory. Doplnění molekulární charakterizace do klasifikace jednoduše odráží pokrok v oblasti tumorigeneze, která se udála posledních dvacet let. Většina genetických změn byla známa už dříve, avšak se na ně pohlíželo pouze jako na prognostické a prediktivní markery v samotných podtypech, které byly do té doby definovány pouze histologicky. Až v roce 2016 došlo ke změně pohledu na tyto alterace a byly využity pro definování přesných podtypů (Tabulka 2). Spojením genotypizace a fenotypizace přineslo určitý stupeň objektivity do diagnostického postupu. Vznikají tak více homogenní skupiny s přesnější diagnózou, což vede k lepšímu managementu léčby, odpovědi na ni a zpřesnění samotné prognózy onemocnění.

Hlavní změny z roku 2016 se týkají restrukturalizace s doplněním geneticky definovaných podskupin u difuzních gliomů, meduloblastomů a embryonálních nádorů, nového přístupu k rozlišení pediatrických nádorů, doplnění nových skupin podle molekulární charakterizace (glioblastom *IDH* wild type/mutovaný, ependymom s *RELA* fúzí, difúzní středočárový gliom *H3K27M* mutovaný) a dále došlo k odstranění již překonaných skupin (gliomatosis cerebri, protoplazmické a fibrilární astrocytomy, celulární ependymom aj.)

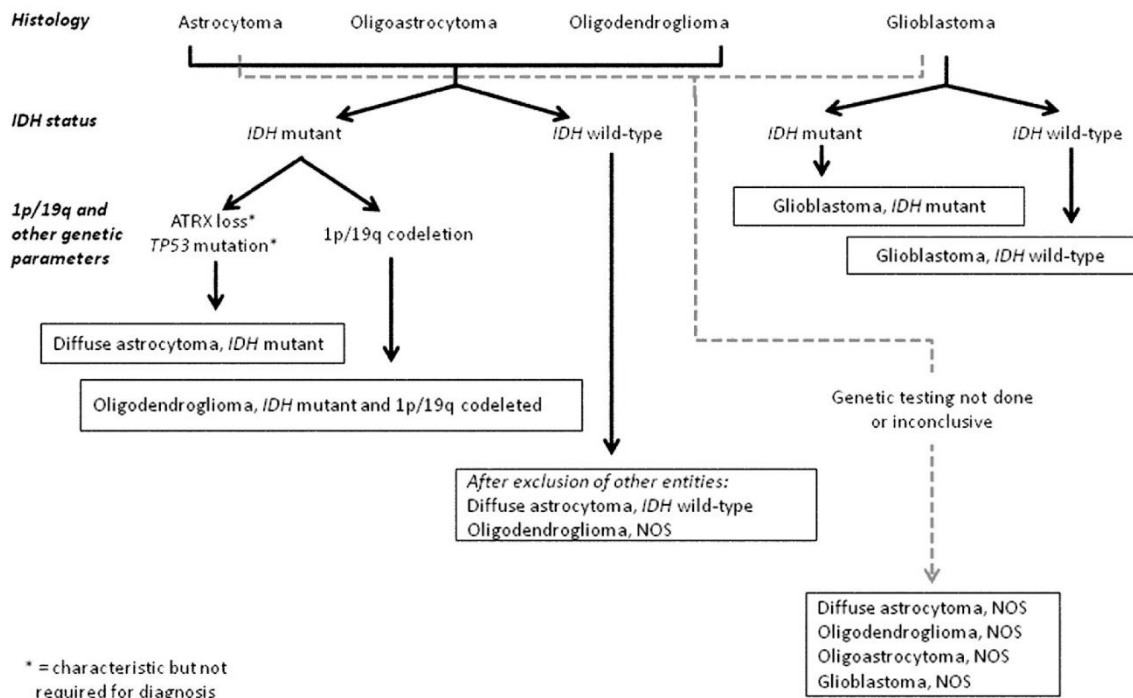
Tabulka 2: Klasifikace, grade a kód morfologie dle WHO 2016.

typ gliálního nádoru	grade	kód morfologie
difúzní astrocytární a oligodendroglíální nádory		
difúzní astrocytom, <i>IDH</i> mutovaný	II	9400/3
gemistocytární astrocytom, <i>IDH</i> mutovaný	II	9411/3
difúzní astrocytom, <i>IDH</i> wildtype	II	9400/3
difúzní astrocytom, nespecifikovaný	II	9400/3
anaplastický astrocytom, <i>IDH</i> mutovaný	III	9401/3
anaplastický astrocytom, <i>IDH</i> wild type	III	9401/3
anaplastický astrocytom, nespecifikovaný	III	9401/3
glioblastom, <i>IDH</i> wild type	IV	9440/3
velkobuněčný glioblastom	IV	9441/3
gliosarkom	IV	9442/3
epiteloidní glioblastom	IV	9440/3
glioblastom, <i>IDH</i> mutovaný	IV	9445/3
glioblastom, nespecifikovaný	IV	9440/3
difúzní středočárový gliom <i>H3K27M</i> mutovaný	IV	9385/3
oligodendrogliom, <i>IDH</i> mutovaný a 1p/19q kodeletovaný	II	9450/3
oligodendrogliom, nespecifikovaný	II	9450/3
anaplastický oligodendrogliom, <i>IDH</i> mutovaný a 1p/19q kodeletovaný	II	9451/3
anaplastický oligodendrogliom, nespecifikovaný	III	9451/3
oligoastrocytom, nespecifikovaný	II	9382/3
anaplastický oligoastrocytom, nespecifikovaný	III	9382/3
ostatní astrocytární nádory		
pilocytární astrocytom	I	9421/1
pilomyxoidní astrocytom	I	9425/3
subependymální velkobuněčný astrocytom	I	9384/1
pleomorfní xanthoastrocytom	II	9424/3
anaplastický pleomorfní xanthoastrocytom	III	9424/3
ependymální nádory		
subependymom	I	9383/1
myxopapilární ependymom	I	9394/1
ependymom	II	9391/3
papilární	II	9393/3
z jasných buněk	II	9391/3
tanycytický	II	9391/3
ependymom s <i>RELA</i> fúzí	II nebo III	9396/3
anaplastický ependymom	III	9392/3

1.3.2.1. Difúzní astrocytární a oligodendroglíální nádory

Dle doplnění klasifikace nádorů CNS z roku 2016 došlo k seskupení difúzně infiltruujících nádorů na základě podobného růstového vzoru a chování, ale hlavním důvodem jsou společné driver mutace v genech pro *IDH1* a *IDH2*. I z prognostického hlediska se jedná o skupinu nádorů se stejnými markery

a podobným směrem léčby, ať už standardní nebo cílené¹². Inovativní algoritmus z roku 2016 vede od histologie přes molekulární parametry vedoucí k přesné diagnóze a je uveden na Obrázku 6.



Obrázek 6: Zjednodušený algoritmus klasifikace difuzních gliomů založených na histologii a genetických znacích. Převzato z originálu¹².

Difúzní astrocytom

Pro difúzní astrocytom je typický pomalý infiltruující růst, vysoká buněčnost, velký počet mitóz a jaderný polymorfismus. Toto onemocnění postihuje dospělé ve středním věku (30-40 let), jeho prognóza je špatná z důvodu častého zvratu v maligní varianty jako je anaplastický astrocytom nebo glioblastom³⁹. Klasifikace difuzního astrocytomu je doplněna o vyšetření na *IDH* mutace. Na základě tohoto vyšetření, které značně zpřesňuje prognózu jednotlivých skupin, se dělí na *IDH* mutovaný, *IDH* wild type a nespecifikovaný. Varianta difuzního astrocytomu *IDH* wild type je málo častá a poslední výzkumy tuto variantu označují spíše za velmi raný glioblastom⁴⁰.

Anaplastický astrocytom

Anaplastický astrocytom je maligní, difuzně infiltruující primární nádor mozku vznikající neoplastickou transformací z astrocytárních buněk a často dochází k jeho progresi v nejmalignější typ gliálního nádoru, tedy glioblastom^{9,41}. Histologicky je anaplastický astrocytom je morfologicky velmi heterogenní; společnými znaky je zvýšená buněčnost s vysokým podílem mitóz, jaderná atypie a přítomnost gliálních markerů bez nekrotických a vaskulárních proliferací⁴². Manifestace tohoto onemocnění je okolo 41 roku⁹, avšak *IDH* mutovaná varianta může postihovat pacienty i dříve⁴³.

Dle WHO 2016 klasifikace se u tohoto typu nádoru nevyskytuje kodelece chromozomů 1p/19q. Rozdělení anaplastického astrocytomy je založeno na statusu IDH, který sebou nese různé klinické a prognostické charakteristiky. IDH mutovaný anaplastický astrocytom je spojován s lepší prognózou; IDH wild type s horší prognózou; a pokud není možné vyšetřit status IDH imunohistochemicky ani sekvenováním, je anaplastický astrocytom klasifikován jako nespecifikovaný¹².

Glioblastom

Glioblastom je nejčastější a nej malignější nádor mozku u dospělých. Histologicky je charakterizován špatnou diferenciací, jadernou atypií, vysokou mitotickou aktivitou, mikrovaskulární proliferací a obsahuje četné nekrózy. Nádor bývá lokalizován v mozkových hemisférách s epicentrem v bílé hmotě a může zasahovat až na povrch mozku. Jak již bylo výše uvedeno, glioblastomy vznikají u mladších pacientů z difúzních a anaplastických astrocytomů nižšího gradu, které označujeme jako sekundární, nebo vznikají *de novo* a jsou označovány jako primární.

Pacienti s glioblastomem mají i přes maximální léčebný režim zahrnující resekci a chemoradioterapii velmi krátkou dobu přežití okolo 12-18 měsíců a pouze 5 % pacientů přežije 5 let. Toto onemocnění se nejčastěji vyskytuje mezi 45. a 70. rokem, s mediánem okolo 64. roku života.

Klasifikace glioblastomů je opět dělena na základě statusu *IDH*, tedy na *IDH* mutované, *IDH* wild type a nespecifikované. V rámci *IDH* wild type glioblastomu, který čítá okolo 90 % všech glioblastomů, jsou dále vyčleněny tři skupiny: velkobuněčný glioblastom, gliosarkom a epiteloidní glioblastom, který byl do klasifikace uveden poprvé.

Difúzní středočárový gliom *H3K27M* mutovaný

Tento gliální nádor byl poprvé zaveden do klasifikace až v roce 2016 a reprezentuje většinu difúzních gliomů mozku kmene. Jedná se o vzácný agresivní nádor se špatnou prognózou přítomný převážně u pediatrických pacientů a ve vzácných případech je nalézán i u dospělých. Difúzní středočárový gliom je lokalizován v mozkovém kmeni, thalamu, míše a mozečku. Pod mikroskopem má podobné znaky jako glioblastom a z tohoto důvodu je pro potvrzení diagnózy vyžadováno molekulární testování na přítomnost mutace *H3K27M*, která je pro tento typ gliálního nádoru specifická^{12,44}.

Oligodendrogliom

Oligodendrogliom je difúzně infiltrující diferencovaný gliální nádor čítající okolo 5 % všech gliálních nádorů dospělých. Oligodendrogliom je dobře diferencovaný gliální nádor gradu II s výskytem v mozkových hemisférách s převahou výskytu v čelním laloku. Neoplastické buňky pod mikroskopem připomínají oligodendrocyty, avšak není doposud přesně zjištěno z jaké buňky je tento nádor odvozen. Vzhledem k nízké proliferační aktivitě, dochází zřídka kdy k recidivě či progresi do vyšších gradů. Pro přesnou diagnózu se vyšetřuje kromě statusu IDH i kodelece chromozomálních oblastí 1p/19q, což dělí tuto skupinu na IDH mutovaný a 1p/19q kodeletovaný a nespecifikovaný^{45,46}.

Anaplastický oligodendrogliom

Anaplastický oligodendrogliom je označen jako grade III a jedná se o maligní formu s horší prognózou. Může vznikat *de novo* nebo jako progresse z oligodendrogliomu. Všeobecně dochází k manifestaci oligodendrogliomů kolem 50. až 60. roku života. Medián doby přežití je u tohoto typu gliálního nádoru okolo 12 až 14 let díky relativně nízké věkové kategorii pacientů⁴⁷. Pro histologický obraz anaplastického oligodendrogliomu jsou typické zvětšené buňky s jadernou pleomorfií, vezikularizací chromatinu, výrazným jadérkem a vyšší mitotickou aktivitou⁴⁸. Pro přesnou klasifikaci je nutné vyšetřit status mutace IDH a stanovit přítomnost kodelece 1p/19q. V případě, že nelze vyšetření uzavřít, je tento anaplastický astrocytom označen jako nespecifikovaný⁴¹.

Oligoastrocytom

Oligoastrocytom má difúzně infiltruující charakter růstu a obsahuje dvě komponenty neoplastických buněk morfoloicky podobných oligodendrogliomu a difúznímu astrocytomu. Histopatologicky je nádor popsán vysoce buněčnými lézemi, které mohou obsahovat mikrokalcifikace a mikrocystické degenerace. Tento typ gliomu je označen jako grade II, má velmi nízkou mitotickou aktivitu a je lokalizován v mozkových hemisférách⁹.

Tento typ gliálního nádoru bylo vždy těžké definovat a docházelo k časté diskordanci. Od roku 2016 tento gliom prakticky mizí na základě ne/přítomnosti molekulárních markerů, které přesně definují oligodendrogliomy (1p/19q kodelece, *IDH* mutace) a astrocytomy (mutace *ATRX*, overexprese p53, nepřítomnost kodelece 1p/19q)⁴¹.

Anaplastický oligoastrocytom

Anaplastický astrocytome je dle WHO označen jako grade III a jedná se o velmi raritní maligní gliální nádor. Nejčastější lokalizace je uváděna ve frontálním a spánkovém laloku. Histologicky je anaplastický astrocytom charakterizován zvýšenou buněčností, jadernou atypií, pleomorfizmem, mikrovaskulární proliferací a vysokou mitotickou aktivitou⁴⁹.

1.3.2.2. Ostatní astrocytární nádory

Do této skupiny patří raritní gliální nádory jako jsou pilocytární astrocytom, subependymální velkobuněčný astrocytom, pleomorfní xanthoastrocytom a anaplastický pleomorfní xanthoastrocytom.

Pilocytární astrocytom je dobře definovaný nádor CNS s dobrou prognózou, vyskytuje se u mladších pacientů a je označován gradem I. V některých případech je pozorována calcifikace a většina těchto nádorů vzniká v mozečku⁵⁰.

Subependymální velkobuněčný astrocytom patří mezi benigní nádory gradu I a je popisován u mladých pacientů do 20 let a jen ojediněle se vyskytuje u starších pacientů. Hlavní léčba tohoto nádoru spočívá v operativním odstranění⁵¹.

Pleomorfni xanthoastrocytom patří mezi nádory označené gradem II, je nalézán u mladších pacientů s nejvyšší incidencí v rozmezí 10. a 30. roku věku a vzniká ze spánkového laloku. Pokud je nalezeno více jak 5 mitóz na 10 zorných polí, jedná se o anaplastický pleomorfni xanthoastrocytom označený gradem III, který je charakterizován značně horší prognózou⁵¹.

1.3.2.3. Ependymální nádory

Ependymomy vznikají z neuroepitelu CNS a vyskytují se jak u dětí, tak u dospělých pacientů. Tyto nádory se vyskytují podél celé nervové trubice zahrnující mozkové hemisféry, zadní mozek a míchu⁹. Klinické chování ependymomů je velmi heterogenní a okolo 40 % pacientů je neléčitelných z důvodu nedostatku efektivní léčby, která se skládá pouze z resekce následovanou radioterapií⁵².

Jedinou molekulární alterací v této skupině gliomů je RELA fúze vyskytující se u pediatrických pacientů. Další molekulární změny čekají na odhalení s přesahem pro přesnější popsání jednotlivých podskupin ependymomů¹².

1.3.3. Souhrn kapitoly

Update klasifikace nádoru CNS z roku 2016 způsobil převrat v klasifikaci, kdy do samotného názvosloví byla přidána přesnější molekulární charakteristika. Tím došlo k rozpadu histologických subtypů do dalších menších skupin se záměrem zpřesnění diagnózy a prognózy jednotlivých nádorů CNS⁴¹. V klinické praxi dochází na základě těchto změn zpřesnění výběru vhodného léčebného režimu, ze kterého by mohly určité skupiny pacientů s gliomy profitovat. Do budoucna se předpokládá, že dojde k dalšímu zpřesňování diagnóz a vývoji cílené terapie právě podle přesnější molekulární charakterizace nádorů CNS.

1.4. Molekulárně cytogenetické změny u gliomů

Před samotnou resekci nádoru dochází k biopsii gliálního nádoru, kdy je tkáň buď zamrazena nebo uchována v médiu pro následné zpracování a histologické vyšetření na patologii. Souběžně s tímto vyšetřením probíhá molekulárně cytogenetická charakterizace nádoru. Jak již bylo řečeno, základním vyšetřením je zhodnocení ne/přítomnosti mutace *IDH*, které se stalo součástí diagnózy. Na základě experimentálních studií bylo odhaleno velké množství dalších molekulárně cytogenetických aberací, které však čekají na validaci a zařazení mezi jednoznačné prognosticko prediktivní markery.

1.4.1. Hereditární nádorové syndromy spojené s výskytem gliomů

Malé procento difuzních gliomů je způsobeno hereditárními syndromy založených na mutaci jediného genu jako je Li-Fraumeni syndrom (*TP53*), neurofibromatóza typu 1 a 2 (*NF1* a *NF2*), Lynchův syndrom (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2*), tuberkulózní skleróza (*TSC1*, *TSC2*), Ollierova choroba (*IDH1*, *IDH2*) a syndrom familiárního melanomu (*p16*)^{53,54}. Molekulární charakteristika gliálních nádorů těchto pacientů se liší od nádorů pacientů bez hereditárního syndromu^{55,56}.

Nad tento rámec existuje přibližně 5 – 10 % případů gliálních nádorů, charakterizovaných familiárním výskytem^{57,58}. Tento výskyt je vysvětlován sdílenou genetickou zátěží spolu s environmentální faktory.

1.4.2. Rizikové faktory

Bylo zjištěno, že kromě genetických faktorů má vliv na vznik nádorů mozku i environmentální prostředí a zdravý životní styl. Mezi prokázaná rizika s velkým vlivem patří ionizační záření, terapeutické ozařování v dětství a CT skenování s dávkami převyšujícími 50 mGy. Všeobecně je ionizující záření považováno za karcinogen, při němž dochází k poškození DNA a následnému možnému spuštění onkogeneze, která nastává v průběhu 7 až 9 let od ozařování⁵⁹. Bylo dokázáno, že terapeutické ozařování v dětství zvyšuje riziko vzniku gliálního nádoru 3x až 7x⁶⁰. Mezi možné avšak těžko prokazatelné patří neionizující záření jako je radiofrekvence elektromagnetických polí.

Na druhou stranu velké množství studií naznačuje, že existuje nižší riziko rozvoje gliálního nádoru u lidí s astmatem, sennou rýmou, atopickým ekzémem popř. alergiemi^{61,62}. To je vysvětlováno zvýšenou imunitní odpovědí a brzkou reakcí imunitní odpovědi na potlačení růstu nádoru⁶¹.

Mezi diskutabilní faktory patří obezita, úrazy hlavy, kouření, konzumace alkoholu a expozice pesticidy⁶³. Například studiemi týkajícími se vlivu kouření na rozvoj gliálních nádorů se závěry bohužel rozcházejí^{64–66}.

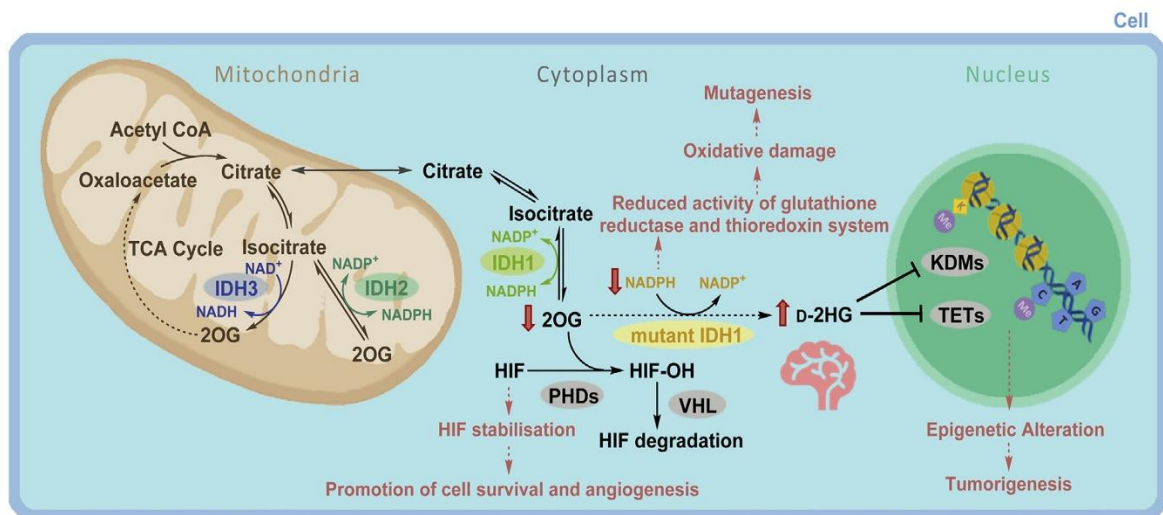
1.4.3. Získané molekulárně cytogenetické změny u gliomů

1.4.3.1. Mutace genu *IDH*

Status mutace *IDH* hraje základní roli v klasifikaci gliálních nádorů od roku 2016, kdy byly integrovány nejen fenotypové projevy gliomů, ale i jejich molekulární charakteristika. *IDH* je enzym, který má 3 izoformy a je zapojen do důležitých metabolických procesů jako je Krebsův cyklus, glutaminový metabolismus, lipogeneze nebo redoxní regulace^{67,68}. *IDH1* se nachází v cytoplazmě a peroxizomech, zatímco *IDH2* a *IDH3* je umístěna v mitochondriální matrix⁶⁹. V charakteristice gliomů se však využívají pouze mutace izoformem 1 a 2; mutace izoformy 3 nebyly prokázány ve spojitosti s tumorigenezí.

Mutace genů pro *IDH 1* a *2* byly poprvé popsány v roce 2008 a jsou lokalizovány v chromozomálních oblastech 2q34 a 15q26⁷⁰. *IDH 1* a *2* jsou Krebsově cyklu nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (NADP^+)-dependentní a katalyzují oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na α -ketoglutarát (α -KG) s produkcí redukovaného nikotinamidadenin dinukleotidfosfátu (NADPH). *IDH 1* a *2* udržují redoxní rovnováhu a ochraňují buňky proti oxidativnímu stresu díky molekulám NADPH a α -KG, které mají silné redukční schopnosti a ochraňují tak DNA proti oxidativnímu stresu⁷¹.

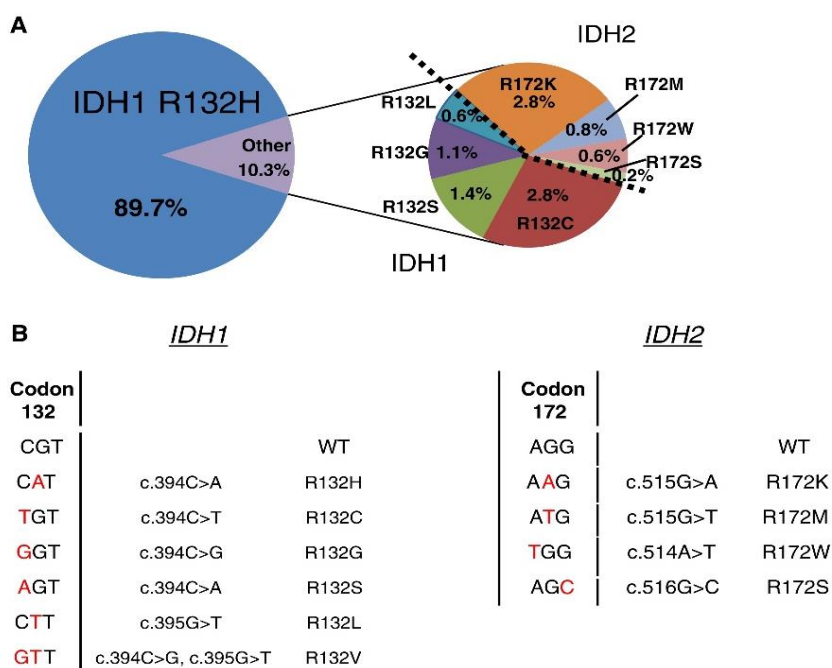
Mutace v *IDH1* a *2* získávají katalyzační schopnost přeměnit α -KG na 2-hydroxyglutarát, což je onkometabolit, který svou kumulací přispívá ke kancerogenezi skrz inhibici demethylace histonů^{72,73}. To dále vede k zastavení buněčné diferenciace. Dalším efektem vysoké koncentrace 2-hydroxyglutarátu je podpora angiogeneze skrz *HIF1 α* (hypoxií indukovaný faktor) a skrz receptor *VEGFR* (vaskulární endoteliální růstový faktor)^{74,75}. Lokalizace variant *IDH* a vliv mutované formy je ilustrován v Obrázku 7.



Obrázek 7: Funkce *IDH* a jejich mutovaných variant v kontextu buněčných pochodů. Je znázorněna různá lokalizace jednotlivých *IDH* a komplexní efekt u mutované varianty *IDH1* vs. wild type, kde skrz metabolické změny dochází k rozvoji tumorigeneze. Převzato z⁷⁶.

2OG - 2-oxoglutarát/ α -ketoglutarát; d-2HG - d-2-hydroxyglutarát; *IDH* - isocitrát dehydrogenáza; *HIF* - hypoxií indukovaný faktor; *HIF-OH* - hydroxylovaný *HIF*; *PHD* - prolyl hydroxylázová doména enzymu *HIF*; *KDM* - histon lysin demethyláza; NADP^+ - nikotinamidadenin dinukleotidfosfát; NADPH - redukovaný nikotinamidadenin dinukleotidfosfát; *TCA* - trikarboxylové kyseliny; *TET* - ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenáza; *VHL* - Von Hippel-Lindau; wt - wild type.

Mutace *IDH* se řadí mezi takzvané driver mutace. Ty se vyskytují na počátku vzniku gliálních nádorů a stabilně přetrvávají i dále v progresi nádoru⁷⁷. *IDH* mutace pravděpodobně vznikají už u prekursorových buněk a právě z nich jsou odvozené oligodendrocyty a astrocyty. K této mutaci se postupně přidávají další alterace a dochází ke zvratu vedoucího k rozvoji gliálního nádoru. Mutace v *IDH1* a *IDH2* jsou ve většině případů missense varianty vedoucí k substituci v jedné aminokyselině. Mutace *IDH1* a 2 se vyskytují pouze v hemizygotním stavu a nevyskytují se společně v jednom nádoru. Nádory nesoucí mutace v *IDH* mají z 90% mutovanou izoformu *IDH1* R132H, kde dochází k záměně argininu za histidin^{78,79}. Zbýlých 10 % připadá na další méně časté varianty *IDH1/2*, které jsou uvedeny v Obrázku 8.



Obrázek 8: Jednotlivé varianty mutací *IDH1* a *IDH2* spolu s jejich A) frekvencemi a B) mutace kodonu 132 u *IDH1* a kodonu 172 u *IDH2*. Převzato z⁷⁸.

IDH mutace jsou často spojovány s dalšími genetickými změnami. Mutace TP53 a ATRX (Alpha-Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked) se vyskytují spolu s mutacemi v *IDH1/2* u 60-70% astrocytomů⁸⁰, zatímco 1p/19q kodelece je spojována s více než 90% oligodendrogliomů⁸¹. U *IDH* mutovaných nádorů jsou nalézány hypermetylace promotoru MGMT, naopak přítomnost amplifikace EGFR je velmi vzácná⁸².

IDH mutace jsou diagnostické, prognostické a prediktivní biomarkery využívané k odlišení jednotlivých typů gliomů a jejich následné léčebné péče. Mutace *IDH* byly nalezeny u zhruba 70 – 80% astrocytomů grade II a III, oligodendrogliomů a většiny sekundárních glioblastomů⁸³. Nádory nesoucí mutaci *IDH* 1/2 vykazují lepší prognózu onemocnění, značně delší přežití bez progresu a celkové přežití oproti pacientům s *IDH* wildtype^{84–86}.

Současná praxe týkající se testování na *IDH* mutace u gliálních nádorů využívá v prvním kroku nejčastější variantu *IDH* R132H, která je vyšetřována imunohistochemicky pomocí monoklonální protilátky. Pokud není prokázána tato varianta, přistupuje se nejčastěji k Sangerovu sekvenování nebo next generation sekvenování na méně časté varianty. K sekvenování se přistupuje pouze u pacientů mladších 55 let dle doporučení WHO z roku 2016. Důvodem je velmi nízká prevalence čítající pouze 1% jiných mutací než *IDH1* R132H u pacientů starších 55 let^{87,88}.

1.4.3.2. Metylace *MGMT*

Gen pro *MGMT* je lokalizován na chromozomální oblasti 10q26 a kóduje takzvaný DNA damage protein, který je klíčový pro zachování genomové stability^{8,89}. Tento protein je schopen odstranit mutagenní alkylační skupinu na O-6 pozici guaninu a zabránit tak mismatch chybám během replikace DNA⁹⁰. Této vlastnosti se využívá při chemoterapii, kdy dochází k indukování alkylace a ta dále spouští cytotoxicitu vedoucí k apoptóze. Nádorové buňky s vysokou hladinou reparačního proteinu *MGMT* působí proti alkylačním činidlům jako jsou nitrosurea a temozolomid a které se využívají při léčbě gliálních nádorů. Temozolomid přidáním alkylační skupiny na thymin a guanin způsobí poškození DNA do takové míry, že vyvolá apoptózu⁹¹. Na základě tohoto mechanismu způsobuje *MGMT* rezistenci na alkylační činidla a nádor tedy ztrácí senzitivitu na léčbu temozolomidem⁸³.

MGMT je epigeneticky regulována skrze promotorovou metylaci, která byla nalezena u 40 % primárních GBM a 70 % sekundárních GBM. Tato metylace byla popsána u poloviny astrocytomů a dvou třetin oligodendrogliomů a oligoastrocytomů⁹². Methylace *MGMT* je využívána jako prediktivní molekulární marker odpovědi na alkylační chemoterapii temozolomidem u glioblastomů³³. Methylace *MGMT* promotoru u *IDH* wildtype gliomů se jeví jako významný prediktivní marker, ačkoli se nijak neprosadil do nové klasifikace gliálních nádorů⁹³.

I přesto, že je tento marker znám už přes dvacet let, doposud nebyla stanovena hlavní metoda pro zhodnocení metylace *MGMT*. Nejvyužívanější metoda detekce je metylačně specifická PCR spolu s pyrosekvenováním, kdy mají obě metody stejnou citlivost⁹⁴. Ostatní metody PCR nebo stanovení proteinu pomocí imunohistochemie či Western Blottingu se využívají pouze sporadicky⁹⁵.

1.4.3.3. Mutace genu *EGFR*

EGFR1 je transmembránová tyrosin kináza umístěná v chromozomální oblasti 7p12. Do rodiny těchto receptorů patří *EGFR2*, *EGFR3* a *EGFR4*, avšak v kontextu gliálních nádorů se sleduje zejména *EGFR1*⁹⁶. *EGFR1* kináza je aktivována vazbou ligandu epidermálního růstového faktoru, popřípadě TGF α (Transforming Growth Factor) nebo jiných raritnějších ligandů. Po následné aktivaci dochází k dimerizaci receptoru, autofosforylaci tyrosinových zbytků a aktivaci proteinů v kaskádě⁹⁷. Signalizace *EGFR* je realizována skrz dráhy MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázy), PI3K a JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) což má za následek zvýšenou proliferaci, inhibici apoptózy, angiogenezi spolu s ovlivněním buněčné migrace, adheze a invaze⁹⁸.

Alterace *EGFR* jsou sledovány napříč různými grady astrocytomů a obzvláště u glioblastomů jsou pozorovány změny jako je overexprese proteinu, amplifikace a delece, které sebou nesou rezistenci na

radioterapii a chemoterapii⁹⁹. Aberace EGFR v kontextu prognózy jsou stále předmětem mnohých studií obzvláště u glioblastomu, u kterého jsou popsány amplifikace ve 40 % případů, overexprese u 60 % případů a mutace v rozmezí od 24 % do 67 %^{100,101}. Experimentálně byla vyzkoušena léčba glioblastomů s aberacemi v EGFR založená na TKI (inhibitory tyrosin kináz) jako jsou erlotinib a gefitinib, na monoklonální protilátce cetuximabu nebo vakcíně proti EGFRvIII (delece exonů 2–7 u EGFR), avšak doposud žádná z těchto variant nepřinesla významné výsledky^{102–105}.

Nejčastější metodou vyšetřování amplifikace EGFR je metoda fluorescenční *in situ* hybridizace, popřípadě imunohistochemické stanovení exprese proteinu. Pro sledování mutací tohoto genu je vhodné využít sekvenování nové generace, kterými lze odhalit mutaci EGFRvIII¹⁰⁶.

1.4.3.4. Kodelece chromozomálních ramen 1p/19q

Pomocí polymorfizmu délky restrikčních fragmentů byla v roce 1994 poprvé popsána ztráta chromozomálních ramen 1p a 19q¹⁰⁷. Kodelece 1p/19q je způsobena nebalancovanou translokací celého raménka chromozomů 1p a 19q, a následnou ztrátou derivovaného chromozomu der(1:19)(p10;q10)¹⁰⁸. Tato změna je popsána u cca 70% oligodendrogliomů gradu II a III¹⁰⁹ a je spojována s dobrou odpovědí na chemoterapii a radioterapii a má vliv na delší celkové přežití a přežití bez progresu¹¹⁰. Oligodendrogliomy s 1p/19q kodelecí a IDH mutací mají nejpříznivější prognózu napříč všemi gliálními nádory. Mediánem přežití je okolo 8 let oproti oligodendrogliomům bez kodelece a bez mutace, kde je medián přežití pouze 1,7 roku¹¹¹.

Kodelece 1p/19q se často vyskytuje spolu s nejčastější variantou mutace IDH1 R132H¹¹¹. Dále je doprovázena mutacemi v TERT (Telomerase Reverse Transcriptase), CIC (homologue of *Drosophila* capicua) a FUBP1 (Far-Upstream Binding Protein 1) spolu s metylací MGMT^{80,111,112}. Naopak pouze raritně se kodelece 1p/19q objevuje spolu s mutacemi v TP53 a ATRX, které charakterizují astrocytární nádory.

Kodelece 1p/19q se využívá přímo v klasifikaci oligodendrogliomů a klinicky využívanou metodou detekce je fluorescenční *in situ* hybridizace z FFPE tkáně, kde se pomocí sond vypočítává poměr signálů 1p/1q a 19q/19p. Dalšími metodami jsou vyšetření ztráty heterozygotnosti (LOH) pomocí PCR, komparativní genomová hybridizace nebo arraye založené na detekci SNP polymorfizmů (single nucleotide polymorphism)¹¹³.

1.4.3.5. Mutace genu *TERT*

Gen pro TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) je lokalizován na 5p15.33 a kóduje katalytickou podjednotku telomerázy, která s počtem dělení zkracuje délku telomer¹¹⁴. Změny ve funkci telomerázy jsou pozorovány napříč všemi nádory a považuje se za hlavní změny vedoucí ke kancerogenezi a progresi¹¹⁵. Zvýšená exprese TERT je ve většině případů způsobena aktivačními bodovými mutacemi záměnou cytosinu za tymidin C228T a C250T v oblasti promotoru s označením pTERT. Tato mutace je nalézána u 78 % oligodendrogliomů a 83 % IDH wild type glioblastomů¹¹⁶.

Low grade gliomy s TERT mutací, 1p/19q kodelecí a IDH mutací byly označeny jako „triple pozitivní“ a mají napříč všemi nádory nejlepší prognózu. Naopak glioblastomy s mutací v pTERT bez ohledu na IDH

mutace, mají horší prognózu než glioblastomy pouze s IDH mutací¹¹⁷. Co se týče predikce odpovědi na terapii, je TERT ve fázi testování. Zatím se zdá, že pacienti léčení chemoradioterapií s IDH wild type glioblastomem vykazujícím metylaci MGMT a mutaci pTERT mají delší dobu přežití^{118,119}.

V současné době se přítomnost bodových mutací pTERT nejčastěji vyšetřuje metodami next generation sekvenováním nebo Sangerovým sekvenováním^{120,121}.

1.4.3.6. Mutace genu *ATRX*

Gen *ATRX* (alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) leží v chromozomální oblasti Xq21.1 a jeho mutace je jedním z charakteristických znaků difuzního astrocytumu¹². *ATRX* patří mezi chromatin remodelující proteiny, je zapojen do regulace transkripce a udržení integrity genomu^{122,123}. Spolu se svým kofaktorem DAXX (death-associated protein 6) hraje klíčovou roli v udržení genomové stability skrz inkorporaci histonů do chromozomálních telomer a pericentromerického heterochromatinu^{124,125}. Jeho ztráta vede k poškození DNA, replikačnímu stresu a dále zřejmě skrz p53 inhibuje apoptózu^{126–128}.

Současná literatura dokazuje přítomnost mutací *ATRX* u IDH mutovaných gliomů, zatímco kodelece 1p/19q je velmi raritní¹². Ztráta genu *ATRX* je charakteristická pro difuzní astrocytom, avšak jak je uvedeno v WHO 2016, není nezbytná pro tuto diagnózu¹². Bylo prokázáno, že ztráta *ATRX* koreluje s věkem, histopatologií a prognózou. Mutace *ATRX* jsou spojeny s lepším přežitím bez progresse celkovým přežitím u IDH mutovaných low grade gliomů bez kodelece 1p/19q¹²⁹.

Metoda vyšetření mutací genu *ATRX* se nejčastěji provádí na FFPE (formalin fixed paraffin embedded) řezech pomocí imunohistochemie, která koreluje s expresí genu¹³⁰. Tato metoda je nejčastěji využívána v klinické praxi. Další zvažovanou metodou může být sekvenace, avšak vzhledem k tomu, že se jedná o velký gen, jeho detekce je obtížná a nákladnější v porovnání s imunohistochemií.

1.4.3.7. Mutace genu *TP53*

P53 je jedním z nejlépe prozkoumaných tumor supresorů, hraje důležitou roli v buněčné homeostáze a jeho aberace jsou pozorovány napříč všemi typy karcinomů včetně gliálních. Gen pro p53 je lokalizovaná v oblasti 17p13.1 a je označován za tzv. strážce genomu, který jakožto transkripční faktor reguluje geny zapojené do buněčného cyklu, apoptózy, diferenciace a odpovědi na poškození DNA¹³¹. U gliálních nádorů jsou popsány delece *TP53*, avšak ve většině případů dochází k modulaci dráhy pomocí jejích upstreamových a downstreamových regulátorů jako jsou například MDM2 (Mouse Double Minute 2 Homolog), ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) a ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated).

Okolo 78 % glioblastomů vykazuje mutaci právě někde v této dráze a zdá se, že právě tato dráha je zodpovědná za progresi nádoru do vyšších gradů¹³². Tumor supresorová aktivita p53 je primárně založena na ovládní exprese nesčetného počtu genů regulujících zástavu buněčného, apoptózu, buněčnou diferenciaci a senescenci^{133,134}. Avšak k tomu, aby se projevil onkogenní mutace *TP53*, musí dojít k mutacím dalších genů, které jsou zodpovědné za progresi glioblastomu jako je například *PTEN*

(Phosphatase and Tensin Homologue), amplifikace *MDM2* nebo velmi častá deregulace *CDKN2A/ARF*^{135–138}. Všechny tyto kroky vedou k progresi glioblastomu, vyšší invazivitě, menším počtem apoptóz a vyšší proliferaci^{139–142}.

Změny p53 na molekulární úrovni jsou pozorovány zhruba u 50 % gliomů gradu II a III, u primárních glioblastomů je četnost 25-30 % a u sekundárních glioblastomů je to dokonce 60-70 %. Z toho plyne, že se jedná o jednu z nejčastějších aberací zapojených do gliomogeneze a může se jednat i o potencionální tzv. driver mutaci^{143,144}. V 90 % případů je mutace genu *TP53* doprovázena mutací *IDH1* u nižších gradů gliomů¹⁴⁵.

Mutace *TP53* jsou doporučovány dle WHO 2016 sekvenovat, popřípadě lze využít PCR metod. Pro detekci delecí tohoto genu lze použít cytogenetickou techniku fluorescenční *in situ* hybridizace a pro sledování aberací proteinu se využívá imunohistochemické stanovení^{12,146,147}.

1.4.3.8. Mutace genu *MDM2*

Gen *MDM2* je lokalizován v chromozomální oblasti 12q13-14 a jeho funkce je založena na inhibici tumor supresorového proteinu p53. *MDM2* je znám pod názvem E3 ubiquitin-protein ligáza *MDM2*, která se váže na p53 a blokuje tedy jeho aktivitu. Na druhou stranu je transkripce *MDM2* indukována pomocí p53, což vytváří zpětnovazebnou smyčku mezi aktivitou p53 a expresí *MDM2*. Amplifikace *MDM2* vede k inaktivaci p53 a tím vypnutí mechanismů bránících rozvoji onkogeneze¹⁴¹. Kromě vlivu na gliomogenezi, má *MDM2* vliv na normální rozvoj centrální nervové soustavy¹⁴⁸

MDM2 amplifikace jsou často pozorovány u GBM a tato mutace vylučuje přítomnost mutace *TP53*¹⁴⁹. Amplifikace *MDM2* jsou pozorovány u 14 % glioblastomů bez přítomnosti mutace *TP53*, proto se nabízí terapie tzv. nutliny cílící na *MDM2* pro reaktivaci p53 dráhy^{150,151}. Problém však nastává s permeabilitou v krevní mozkové bariéře a navíc většina glioblastomů nese mutaci v *TP53*¹⁵². Tato léčba bohužel ve většině případů selhává a má jen nízkou míru úspěšnosti.

Vyšetření míry exprese *MDM2* lze provést pomocí imunohistochemického stanovení pomocí protilátek, amplifikace genu lze stanovit pomocí *in situ* hybridizace popřípadě sekvenováním^{153–155}.

1.4.3.9. Mutace genu *PTEN*

PTEN je lokalizován v chromozomální oblasti 10q23.3 a jeho aberace jsou popsány v celé řadě nádorových onemocnění včetně gliálních nádorů¹⁵⁶. Jedná se o tumor supresor zapojený do regulace buněčné proliferace, adheze spolu s buněčnou invazivitou, apoptózou a opravou poškozené DNA^{157,158}. Ztráta exprese *PTEN* se řadí mezi aberace zapojené do časně gliomogeneze s četností mezi 5 – 40 % případů gliálních nádorů^{159,160}. Všeobecně *PTEN* hraje roli jak v neurogenezi tak gliomogenezi a zároveň je spojován s maligní progresí gliálních nádorů^{161–164}.

Častou aberací popisovanou u primárního a sekundárního glioblastomu jsou delece podél chromozomálního ramene 10q čítající 70 % glioblastomů a jak již bylo zmíněno, v této oblasti 10q23 se kromě jiných tumor supresorů vyskytuje i gen pro fosfatázu *PTEN*^{39,165}. Je dokázáno, že mutace v tomto

genů jsou zapojeny i do maligní progresy gliomů a korelují s kratším celkovým přežitím¹⁶⁶. Co se týče vlivu na prognózu, existují napříč literaturou nekonzistentní závěry.

Jako všechny ostatní kandidátní geny zapojené do gliomogeneze, lze *PTEN* sledovat na úrovni genové pomocí sekvenování, PCR metodami a po cytogenetické stránce je možné delece sledovat pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace^{167–169}. Pomocí expresní imunohistochemie a příslušné protilátky proti *PTEN* lze sledovat i jeho míru exprese¹⁶⁷. S nástupem microarrayů lze využít sledování většího množství kandidátních genů pomocí nové generace čipů, využívající analýzy od genů přes RNA až po proteiny^{169,170}.

1.4.3.10. Mutace genu *CDKN2A*

Gen pro *CDKN2A* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) je lokalizován v chromozomální oblasti 9p21.3 a je jakožto tumor supresor spojován s tumorigenezí a špatnou prognózou u velkého množství nádorových onemocnění. Nejčastější alterací *CDKN2A* je ztráta/delece a v minoritě se jedná o mutace¹⁷¹. Gen pro *CDKN2A* kóduje dva alternativní transkripty p16 (p16INK4A) a p14 (p14ARF) zapojené do regulace buněčného cyklu. P16 inhibuje komplex CDK4/6-cyklin D a tak zabraňuje progresi buněčného cyklu z G1 do S fáze. Naproti tomu p14 inhibuje vazbu MDM2 na p53, který dále řídí expresi p21 a ten blokuje komplexy CDK/cyklin. Z toho vyplývá, že pokud dojde k deleci popřípadě snížené expresi produktů genu *CDKN2A*, dochází ke ztrátě negativní regulace buněčného cyklu.

Homozygotní delece genu *CDKN2A* je všeobecně spojována s horším přežitím gliálních nádorů i u IDH mutovaných oproti IDH nemutovaným^{172,173}. Nižší exprese produktu *CDKN2A*/p16 je pozorována u maligních gliálních nádorů vyššího gradu než u gliálních nádorů s nižším gradem¹⁷⁴. Dokonce okolo 60-80 % gliomů vyššího gradu má ztrátu tumor supresoru p14 způsobenou homozygotními mutacemi¹⁷⁵. Co se týče jednotlivých subtypů, *CDKN2A* delece jsou spojovány s horším celkovým přežitím u astrocytomů, avšak toto neplatí u oligodendrogliomů a oligoastrocytomů¹⁷⁶.

Ke sledování alterací produktů *CDKN2A* se nejčastěji využívá imunohistochemické stanovení s příslušnými protilátkami¹⁷⁷. Co se týče samotného sledování ztráty *CDKN2A*, tak se nejčastěji využívá metody fluorescenční *in situ* hybridizace, popřípadě metod PCR nebo sekvenování pro sledování mutací^{176,178,179}.

1.4.3.11. Mutace genu *CCND1*

Gen *CCND1* (Cyclin D1) leží v chromozomální oblasti 11q13.3 a jeho produkt je klíčovým regulátorem přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu¹⁸⁰. Vazbou cyklinu D1 na cyklin dependentní kinázy CDK4 nebo CDK6 dochází k následné fosforylaci Rb1 proteinu a spuštění transkripce genů zapojených do přechodu buněčného cyklu z G1 do S fáze^{181,182}. Jako většina genů zapojených do regulace buněčného cyklu, je i *CCND1* popisován napříč širokým spektrem nádorových onemocnění.

Je dokázáno, že inhibice exprese *CCND1* u glioblastomu je spojována se zvýšenou senzitivitou na temozolomid¹⁸³. Na *in vivo* modelech bylo zjištěno, že downregulace *CCND1* u glioblastomových linií snižuje jejich proliferační aktivitu a navíc i jejich invazivitu^{184,185}.

Ke sledování genu *CCND1* se využívá klasické PCR metody, popřípadě pro sledování polymorfizmů se využívá metody ARMS-PCR (Amplification-Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction) nebo samotného sekvenování. Pro vyšetření míry exprese se využívá blotovacích metod popřípadě imuhistochemické stanovení^{183,186}.

1.4.3.12. Mutace *H3K27M*

Difuzní středočárový gliom je charakterizován dle nové klasifikace mutací v *H3K27M* (záměna lyzinu 27 za methionin u histonu H3)¹². Tento nádor je charakterizován vysokou agresivitou a jedná se zejména o pediatrický nádor s přesahem k mladším dospělým¹⁸⁷. Pacienti s tímto onemocněním mají špatnou prognózu, medián přežití je pouze 9-11 měsíců bez závislosti na lokalizaci a z tohoto důvodu je označen jako grade IV¹⁸⁸.

Zdá se však, že mutace *H3K27M* se vyskytuje i u pacientů s glioblastomem¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Všeobecně se tedy jedná o mutaci se špatnou prognózou, avšak vzhledem k tomu, že se jedná o nové informace, je potřeba zjistit vliv této mutace i na glioblastom. Uveřejněné studie tuto mutaci našly pouze u glioblastomů s IDH wild type.

Vzhledem k tomu, že se jedná o bodovou mutaci, je nejvhodnější vyšetření pomocí sekvenování nebo pomocí imunohistochemických protilátek cílených na specifické mutace^{192,193}.

1.4.3.13. Další aberace

PI3K/Akt/mTOR dráha je aktivována u skoro 90 % glioblastomů^{132,194}. PI3K dráha je velmi komplexní kaskáda, která řídí velké množství buněčných pochodů jako je migrace, přežití a proliferace¹⁹⁵. Tato dráha je nejčastěji aktivována skrze mutaci v PTEN, který funguje jako negativní regulátor¹⁴⁵. Tato dráha hraje roli i v motilitě buněk glioblastomu a cílená terapie je doposud ve fázi testování¹⁹⁶⁻¹⁹⁸.

Neovaskularizace je znakem gliálních nádorů vyššího gradu a právě angiogenní faktory hrají důležitou roli v malignitě nádoru. Právě VEGFR (receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru) je hlavním faktorem angiogeneze a je sledován u 64 % glioblastomů. VEGFR se jeví jako potencionální prognostický faktor, kdy byla nalezena silná korelace mezi expresí VEGFR a přežitím¹⁹⁹.

BRAF je serin/threonin kináza, která je označena jako proto onkogen a skrz dráhu MAPK (mitogen activated protein) kináz hraje roli v tumorigenezi velkého množství nádorů včetně gliomů²⁰⁰. Mutace *BRAF* V600E bodová mutace s výskytem napříč gliálními nádory^{201,202}. U pediatrických nádorů je spojován s rekurencí po standardní terapii²⁰³. Další známá aberace *BRAF* je vznik fúzního genu s *KIAA1549*, který je pozorován u 60-80 % sporadického pilocytárního astrocytomu²⁰⁴.

Signalizace tyrozin kinázového receptoru PDGFRA (Platelet Derived Factor Receptor Alpha) je spojována s normálním vývojem CNS, regulací gliální proliferace a oligodendrocytární diferenciací²⁰⁵. Overexprese proteinu PDGFRA je přítomna u 30 % gliomů a amplifikace byla nalezena pouze u 20 % gliomů. Aberace *PDGFRA* hrají klíčovou roli v gliomogenezi a její progresi²⁰⁶. Kromě těchto aberací byly v menším počtu prokázány i delece, bodové mutace a přestavby²⁰⁷.

1.4.4. Cílená léčba

Cílená léčba si našla uplatnění u solidních nádorů jako jsou plíce, prsa, kolorekta atp. Bohužel co se týče gliálních nádorů, většina studií končí neúspěchem ve fázi III. Hlavní příčinou se jeví hematoencefalická bariéra, klonální evoluce nádorových buněk, nádorová heterogenita spolu s difuzním růstem gliálních nádorů.

Bevacizumab je protilátka cílící VEGFR a inhibuje vaskularizaci. V roce 2009 v USA byl schválen samostatně nebo v kombinaci s irinotekanem jako léčba pacientů s rekurentním glioblastomem, avšak efekt je stále diskutabilní²⁰⁸. Nejznámější protilátka proti EGFR je cetuximab, ten byl však bezúspěšně testován u pacientům s rekurentním glioblastomem.

Dalším velmi diskutovaným směrem léčby jsou vakcíny založené na purifikovaných tumor specifických antigenech popřípadě extraktech derivované z resekovaného nádoru. Takzvaná DCVax vakcína dendritických buněk je schválena ve Švýcarsku pro léčbu glioblastomu a koreluje s prodlouženým celkovým přežitím a přežitím bez progresu²⁰⁹.

Kromě této imunoterapie stojí za zmínku u checkpointové blokátory, monoklonální protilátka rindopeptimud proti EGFRvIII, vakcína s heat shock proteiny nebo léčba rekombinantními polioviry. Na závěry z těchto studií si však musíme ještě počkat. Z důvodu obtížné administrace léčiva skrz hematoencefalickou bariéru do míst nádoru, jsou testovány i inovativní přístupy. Ve fázi testování jsou micely s léčivem nebo nanočástice³⁶.

1.4.5. Souhrn kapitoly

S rozvojem sekvenování, čipových technologií a dalších high throughput screeningových metod, lze postupnými kroky odkrývat molekulární pozadí veškerých nádorových onemocnění včetně gliálních nádorů, které jsou doposud zřejmě největší výzvou vzhledem k agresivní povaze onemocnění. Díky zařazení těchto metod a algoritmů do klinické praxe, lze co nejpřesněji stavět přesnou diagnózu. Kombinace aktualizace klasifikace dle WHO 2016 a charakteristických aberací je uvedena v Tabulce 3.

Postup přesné klasifikace zatím nevychází z analýzy všech molekulárních markerů uvedených výše, avšak myšlenka vytvoření tzv. vrstvené integrované diagnózy zahrnující základní markery, byla naznačena již v roce 2014²¹¹. Tento princip zahrnuje 4 vrstvy, které se doplňují v přesné stanovení diagnózy: molekulární informace, WHO grade, histologická klasifikace a poslední vrstva je integrovaná diagnóza.

Tabulka 3: Nejčastější nalezené změny u jednotlivých subtypů difuzních astrocytárních a oligodendroglálních nádorů dle WHO 2016 klasifikace. Upraveno dle ²¹⁰.

WHO 2016	časté molekulární aberace	WHO 2016	časté molekulární aberace		
GBM, <i>IDHwt</i>	mutace <i>TP53</i>	GBM, <i>IDHmut</i>	mutace <i>TP53</i>		
	ztráta chromozomu 10		ztráta chromozomu 10		
astrocytom, <i>IDHwt</i>	delece <i>CDKN2A</i> nebo <i>CDKN2B</i>	oligodendrogliom, <i>IDHmut</i>	delece <i>CDKN2A</i> nebo <i>CDKN2B</i>		
	amplifikace <i>EGFR</i>		metylace <i>MGMT</i> 90 %		
	mutace <i>PDGFRA</i>		mutace <i>CIC</i>		
	mutace <i>NF1</i>		mutace <i>FUBP1</i>		
	navýšení chromozomu 7		mutace <i>NOTCH1</i>		
	mutace <i>PTEN</i>		mutace <i>PI3K</i>		
	amplifikace <i>MDM2</i>		delece <i>CDKN2A</i> nebo <i>CDKN2B</i>		
	metylace <i>MGMT</i> 40 %		metylace <i>MGMT</i> 65-100 %		
	astrocytom, <i>IDHwt</i>		ztráta <i>PTEN</i>	astrocytom, <i>IDHmut</i>	mutace <i>TP53</i>
			amplifikace <i>EGFR</i>		delece <i>CDKN2A</i> nebo <i>CDKN2B</i>
mutace <i>TP53</i>		amplifikace <i>MYC</i>			
mutace <i>PIK3CA</i>		mutace <i>RTK</i> nebo <i>RIS</i>			
metylace <i>MGMT</i> 55 %		metylace <i>MGMT</i> 85 %			

Objev molekulárních markerů a jejich integrace do klinické praxe a cílené léčby se uplatnil napříč celým spektrem solidních nádorů. To bohužel ale neplatí pro gliální nádory. I přes velký počet studií zaměřených na cílenou terapii, končí většina neúspěšně již ve fázi tři klinického testování a pouze ojedinělé případy terapeutik jsou schváleny pro glioblastom.

2. Experimentální část

2.1. Cíle práce

Vzhledem k nové klasifikaci nádorů CNS, kde jsou u difúzních astrocytárních a oligodendroglálních nádorů posuzovány nejen histologické parametry, ale nově je k nim přiřazen i klíčový status *IDH* a kodelece 1p/19q. Pro přesnou klasifikaci je důležité se řídit takzvanou vrstvenou klasifikací založenou na molekulární informaci, WHO gradu, histologické klasifikace a poslední vrstvou je integrovaná diagnóza. Klíčovým parametrem pro posuzování prognózy a léčebného směru pacientů s gliálním nádorem je v současné době wild type/mutovaný *IDH* gen.

Dle WHO je doporučováno imunohistochemické stanovení varianty *IDH1* R132H u všech pacientů a následně, pokud se jedná o pacienty IHC R132H negativní a mladší 55 let, využít sekvenování pro méně časté varianty. Odůvodněním je 90 % přítomnost této varianty u gliálních nádorů a pouze v 10 % případech se jedná o raritní varianty *IDH*. Vzhledem k tomu, že se nyní jedná o nejdůležitější molekulární marker, je v zájmu dobré klinické praxe jeho přesné stanovení.

Jak již bylo zmíněno, *IDH* status je označen jako prognosticko prediktivní marker a odlišení pacientů s wild type nebo mutovanou variantou je nutností. To je však s ohledem na velké množství získaných informací o molekulárně cytogenetické podstatě tohoto onemocnění stále pouze špičkou ledovce. V rámci podskupin definovaných dle statusu *IDH* zůstává ještě velký prostor pro další rozdělení na základě přesnější molekulární charakteristiky.

Cílem předkládané doktorské práce bylo studium molekulárně genetických alterací u gliálních nádorů v souvislosti s jejich klinickými charakteristikami se zaměřením na přesnou diagnostiku mutací *IDH1/2*:

1. Provedení porovnávací metodické studie sekvenačních metod pro přesné stanovení mutací *IDH1/2*.
2. Provedení molekulárně genetické analýzy vzorků glioblastomů po selekci pouze na *IDH* wild type a stanovení prognostické role vyšetřovaných biomarkerů u této skupiny.

2.2. Mutace IDH1/2 u českých pacientů s difúzním gliomem: retrospektivní masivně paralelní analýza z jednoho centra

2.2.1. Úvod

Světová zdravotnická organizace donedávna klasifikovala nádory centrálního nervového systému pouze podle histologické charakteristiky. V roce 2016 byla tato charakteristika rozšířena o molekulární parametry^{12,211,212} z důvodu zlepšení diagnózy a léčby pacientů. Zejména genetické markery (*IDH1/2*, *ATRX*, *TP53* a kodelece 1p/19) sloužící jako diagnostické nástroje vedly k vývoji robustních a reprodukovatelných algoritmů, které v porovnání se samotnou histologií přesněji predikují přežití pacientů.

Exomové sekvenování glioblastomů z roku 2008 odhalilo missense mutace isocitrát dehydrogenázy¹⁷, což je gen zapojený do Krebsova cyklu. To vedlo k objasnění častých genetických změn během časné fáze vzniku gliomů a sekundárního glioblastomu, což značně pomohlo k pochopení gliálních nádorů a zlepšení jejich klasifikace. *IDH1* a *IDH2* se uplatňují v buněčných procesech jakými jsou odpověď na glukózový metabolismus, lipogeneze a regulace redoxního stavu²¹³. Za normálních okolností katalyzuje enzym IDH konverzi isocitrátu na α -ketoglutarát pomocí dekarboxylace. Nejčastější aberace gliomů jsou mutace v aminokyselinových zbytcích *IDH1* a *IDH2*, přesněji Arg132 a Arg172. Tyto mutace indukují neomorfickou enzymovou aktivitu: místo wild type aktivity katalyzují mutované proteiny redukci α -ketoglutarátu na onkometabolit D-2-hydroxyglutarát vedoucí k maligní transformaci zahrnující epigenetické změny a aberantní diferenciaci⁷². Mutace *IDH1/2* byly identifikovány jako markery přežití^{214,215} a právě tyto mutace se staly zásadními diagnostickými nástroji používanými v klinické praxi u gliálních nádorů¹².

Incidence mutací *IDH1* je u glioblastomu okolo 12 %⁷, v případě gliomů grade II-III a sekundárních glioblastomů byly mutace nalezeny přibližně u 80 % vzorků^{216–220}. Mutace *IDH2* jsou méně časté a vzájemně se vylučují s mutacemi v *IDH1*^{221,222}. Všechny mutace *IDH1* a *IDH2* vyskytující se u glioblastomů jsou missense mutace v jediné aminokyselině a to argininu 132 (*IDH1* R132) a 172 (*IDH2* R172). Nejčastější variantou je *IDH1* R132H s incidencí čítající 85 % gliomů²²³ a projevuje se jako heterozygotní missense mutace, kde dojde k záměně argininu na histidin (CGT→CAT). Tato mutace mění aktivní místo enzymu, snižuje jeho katalytickou aktivitu a afinitu k isocitrátu²²⁴.

Detekce variant R132 a R172 má vliv na diagnózu gliomů²²⁵, prognózu^{222,226} a potencionálně i léčbu^{227,228}. Bohužel pouze tato varianta je detekovatelná imunohistochemicky, vyšetření dalších variant je možno pouze Sangerovým sekvenováním nebo next generation sekvenováním¹². Na základě studií vyšetřujících efekt věku pacienta, grade nádoru a status *IDH1* R132H pomocí imunohistochemie, je doporučení WHO z roku 2016 sekvenovat pacienty s gliomem mladší 55 let pro odhalení raritních variant *IDH* v případě, že byli dle imunohistochemie *IDH1* R132H negativní^{12,87,229}. Vyšetření na mutace *IDH* se tak stalo v případě gliálního nádoru klíčovým diagnostickým nástrojem, avšak tento přístup není nákladově efektivní u všech pacientů⁸⁷.

Vzhledem k tomu, že stav mutací *IDH* je zásadní pro diagnostický algoritmus pro integrovanou klasifikaci difúzních astrocytárních a oligodendrogliálních nádorů, je v dnešní době odhalení skutečně pozitivních/negativních vzorků nutností. Naším cílem bylo odhalit vzorky pomocí masivního paralelního sekvenování, které byly označeny pomocí imunohistochemie jako falešně negativní a zda

existuje způsob pro snížení výdajů a/nebo zvýšení účinnosti genotypování za použití různých metod next generation sekvenování. Naše fast IDH metoda je vhodná pro genotypizaci známých hot spotů u somatických mutací a vykazuje konkordantní výsledky s komerčně dostupným kitem (Nextera XT kit, Illumina).

2.2.2. Materiál a metodika

Studovaná skupina a vzorky tkáně

Studovaná kohorta se skládala z 275 pacientů s gliomem, kteří podstoupili chirurgické odstranění nádoru na Neurochirurgické klinice v Olomouci mezi roky 2011 a 2017. Tkáň od každého pacienta byla uchována jako FFPE a tyto vzorky byly validovány patologem se zkušenostmi s CNS nádory.

Imunohistochemie

Tkáňové řezy o tloušťce 1-2 μm byly předem ošetřeny pomocí systému PT Link (Agilent) při 97 ° C, pH 9 po dobu 20 minut, aby se zajistilo odkrytí epitopu. Peroxid vodíku byl použit na blokování endogenní peroxidázové aktivity. Řezy byly následně ošetřeny primární protilátkou, Anti-IDH1 R132H, klon H09 (Dianova, Hamburg, Německo), v ředícím poměru 1:100 po dobu 20 min při pokojové teplotě. EnVision Flex+, Mouse, High pH (Agilent DAKO) byl použit pro amplifikaci signálu primární protilátky. Po aplikaci sekundární protilátky EnVision, Flex/HRP (Agilent DAKO) po dobu 20 min, bylo k vizualizaci reakce použito systému DAB+ Substrate Chromogen (Agilent DAKO).

Fluorescenční *in situ* hybridizace

Kodelece 1p/19q byla detekována pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která byla provedena na FFPE tkáních dle doporučení výrobce (IntellMed, Ltd., Olomouc, Czech Republic). Pro zjištění počtu kopií chromozomů byly použity lokusově specifické sondy pro oblasti 1p36.3 a 19q13. Alespoň 100 nepřekrývajících se jader bylo vyšetřeno v každém vzorku.

Genotypizace IDH1 a IDH2 pomocí next generation sekvenování

Protokoly používané pro extrakci DNA z FFPE tkáňových řezů a genotypizace *IDH1* R132 a *IDH2* R172 jsou uvedeny níže. Ke zvýšení spolehlivosti výsledků byly použity dvě metody založené na NGS. Genotypování se také opakovalo v případě nesouhlasných výsledků. První metoda zahrnovala amplifikaci specifických oblastí a přípravu knihovny pomocí tagmentace (Nextera XT kit, Illumina). Druhá metoda fast zahrnovala amplifikaci se specifickými primery obsahujícími přesahy potřebné pro sekvenování.

Genotypizace *IDH1* R132 a *IDH2* R172 metodou fast IDH

Pro obě metody sekvenování byla vyizolována DNA pomocí Roche Cobas® kit and a Cobas® DNA sample preparation kitu. QPCR amplifikace byla provedena za použití 1 µl or 5 µl celkové DNA (v závislosti na koncentraci: > 30 ng/µl nebo > 10 ng/µl) pomocí Thermo-Start Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, 1U), 10X PCR Thermo-Start Buffer (ThermoFisher Scientific) MgCl₂ (ThermoFisher Scientific), dNTP (Bioline) a EvaGreen 20x (Biotinium). PCR primery byly vyrobeny firmou Generi-Biotech a z důvodu licencování této technologie firmou Biovendor (Brno, Česká republika) nejsou uvedeny. Očekávané uvedení na trh je přibližně druhý nebo třetí kvartál 2021. PCR multiplex reakce (*IDH1* a *IDH2* reakce) byla provedena za těchto podmínek: 95 °C po dobu 2 min, poté 40 cyklů s profilem: 15 s při 95 °C, 30 s při 62 °C a 30 s při 72 °C (pro fluorescenční skenování byl nastaven FAM kanál), konečná inkubace byla po dobu 5 min při 72 °C a tání nastaveno od 60 °C do 95 °C se skenováním fluorescence kanálem FAM při 0,5 °C. Po amplifikaci následovala purifikace amplikonů pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Hilden, Německo, QIAGEN). Koncentrace produktu byla změřena pomocí Qubit 2.0 HS DNA kit (Invitrogen). Sekvenační knihovna byla zředěna a denaturována 0,1 M NaOH (koncentrace DNA = 10 µM). Knihovna obsahovala přibližně stejné množství každého vzorku. Sekvenování bylo provedeno na sekvenátoru Illumina MiSeq pomocí sady MiSeq V2 Nano 300 bp nebo V3 150 bp za použití sekvenčních čtení 2 x 75 bp s vlastními sekvenčními primery, které jsou součástí uvedené technologie. Analýza byla provedena pomocí softwaru MiSeq Reporter pomocí funkce Somatic Variant Caller. Výstupní soubory vcf byly zpracovány pomocí aplikace Excel (Microsoft). Za účelem identifikace mutací v genech *IDH1* a *IDH2* byla stanovena kritéria pro mutace přítomné v kodonech 132, 172 s frekvencí > 5% a pokrytím > 1000.

Genotypizace *IDH1* R132 a *IDH2* za použití Nextera XT Library Prep Kit

Pro sekvenování *IDH1* R132 a *IDH2* R172 byla pro amplifikaci odpovídající DNA sekvence použita metoda PCR. Složení PCR master mixu bylo následovné: 0,5x EvaGreen® Dye (Biotium Inc., Fremont, CA, USA), 1U ThermoStart polymerase s doporučeným 1x buffer (ThermoScientific, Waltham, MA), 200 µM dNTPs (Bioline, London, UK), 2 mM MgCl₂ (ThermoScientific, Waltham, MA) a 0,25 µM primerových páru uvedených v Tabulce 4 (Generi Biotech, The Czech Republic). Přibližně 20 ng DNA bylo doplněno DEPC-vodou (ThermoScientific, Waltham, MA) do objemu 20 µl. Z důvodu odlišných T_m hodnot, byla použita touchdown PCR na cykleru LightCycler®480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Podmínky amplifikace byly následovné: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 15 min, poté 1°C/cyklus, touchdown cykly po 15s (začátek při 95 °C), poté 35 cyklů při 95 °C po dobu 10 s, 60 °C po dobu 15 s, a 72 °C po dobu 15 s. Pro evaluaci dat byl použit LightCycler®480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) a kontrola kvality byla provedena pomocí QIAxcel® (QIAGEN, Hilden, Germany).

PCR produkty byly purifikovány pomocí QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) a koncentrace amplikonů byla změřena na IMPLEN NanoPhotometer Pearl® (Implen, München, Germany). Příprava knihovny byla provedena za použití Nextera™ XT Library Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) a Nextera™ XT Index Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) dle návodu od výrobce. PCR produkty a indexy byly přečištěny pomocí QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) a finální koncentrace byla změřena na Qubit® 2.0 (Life Technologies, MA, USA). Sekvenování a analýza byla provedena pomocí MiSeq a MiSeq Reporter software za použití Somatic Variant Caller funkce se stejnými parametry jaké byly použity u fast IDH metody.

Tabulka 4: Primery použité pro amplifikaci *IDH1* R132 a *IDH2* R172 při použití metody Nextera XT.

gen	primer	sekvence DNA	délka ampliconu
IDH1 R132	forward	5'-CGGTCTTCAGAGAAGCCATTAT-3'	100 bp
	reverse	5'-TCACATTATTGCCAACATGACTTAC-3'	
IDH2 R172	forward	5'-AAACATCCCACGCCTAGTCC-3'	200 bp
	reverse	5'-AGGTCAGTGGATCCCCTCTC-3'	

2.2.3. Výsledky

2.2.3.1. Imunohistochemie

Vzorky 275 pacientů (průměrný věk = 60,2 let) byly histologicky hodnoceny patologem dle doporučení CNS WHO z roku 2016, z nichž 11 vzorků nebylo možné imunohistochemicky vyšetřit na *IDH1* R132H (Tabulka 5)¹². Vzorky byly následně rozděleny podle positivity IHC R132H (mutované) nebo negativity (WT). Data byla stratifikována podle podtypu nádoru; imunoreaktivita R132H byla pozorována u 60 z 275 vzorků (22 %).

Tabulka 5: Histologické subtypy difuzních gliomů zahrnutých do studie jednoho centra provedenou mezi roky 2011 – 2017 a charakteristika jednotlivých podskupin.

diagnóza	grade	N/celkem (%)	M/Ž	průměrný věk/rozpětí
IHC – <i>IDH1</i> R132H WT				
oligodendrogliom	II	1/10 (10 %)	0/1	9,3
kodelece 1p/19q		0/0 (0 %)	0/0	-
anaplastický oligodendrogliom	III	4/12 (33,3 %)	2/2	54,1 (30,3-54,1)
difuzní astrocytom	II	17/40 (42,5 %)	10/7	43,0 (22,8-76,1)
anaplastický astrocytom	III	22/35 (62,9 %)	9/13	64,6 (33,2-81,6)
glioblastom	IV	162/178 (91,0 %)	104/58	61,8 (23,7-84,3)
IHC – <i>IDH1</i> R132H mutovaný				
oligodendroglioma	II	9/10 (90 %)	6/3	49,3 (33,1-73,0)
kodelece 1p/19q		6/8 (75 %)	4/2	51,7 (34,3-73,0)
anaplastický oligodendrogliom	III	8/12 (66,7 %)	3/5	49,6 (33,1-68,7)
difuzní astrocytom	II	22/40 (55 %)	10/12	42,3 (23,1-70,8)
anaplastický astrocytom	III	9/35 (25,7%)	5/4	40,0 (27,6-56,7)
glioblastom	IV	12/178 (6,7 %)	7/5	47,9 (33,8-75,2)

WT - wild type, M - muži; Ž - ženy.

2.2.3.2. FISH

Všeobecně nejsou u oligodendrogliomu²³⁰ stanoveny závazné cut off hodnoty detekce delecí 1p nebo 19q, proto jsme cut off stanovili na 20 % jader obsahujících pouze jednu kopii. Analýza FISH prokázala přítomnost kodelece 1p/19q v 6 z 8 IHC R132H pozitivních vzorků; i přes opakování nebylo možné jeden vzorek analyzovat zřejmě kvůli chybě zpracování tkáně.

2.2.3.3. Sekvenování IHC *IDH1* wild type pacientů mladších 55 let

Pro maximalizování efektivity nákladů danou nízkou prevalencí mutací *IDH* u pacientů ≥ 55 let⁸⁷, byly sekvenovány pouze nádory od pacientů mladších 55 let s *IDH1* WT podle IHC vyšetření (n = 63) (Tabulka 5). Výsledky sekvenování prokázaly, že 10 z 63 vzorků (16 %) vykazovalo mutaci *IDH1* R132 nebo *IDH2* R172. Obě uvedené metody sekvenování poskytly konzistentní výsledky pro všech deset pozitivních vzorků; 2 vzorky nebylo možné analyzovat alespoň jednou z metod (Tabulka 6). Podle očekávání byly detekovány vzácné mutace *IDH1* (společný výskyt R132S a R132C ve 3 vzorcích). Dále bylo zjištěno, že 3 vzorky nesou vzácné mutace *IDH2* v kodonu 172, které nelze imunohistochemicky detekovat. U 4 vzorků byla nalezena mutace *IDH1* R132H i přesto, že byly tyto vzorky označeny dle imunohistochemické analýzy jako *IDH1* R132H wild type. Dva vzorky nebylo možné analyzovat kvůli nízké kvalitě DNA a špatné PCR amplifikaci. Jeden vzorek z celkových 11 vzorků, které nebylo možné imunohistochemicky stanovit a splnil věkové kritérium, byl jednoznačně vyšetřen jako pozitivní na mutaci *IDH1* R132H (Tabulka 6, případ č. 8).

Tabulka 6: Charakteristika pacientů a výsledky genotypizace získané metodami FastIDH method a Nextera XT Library Prep Kit.

č.	věk	pohl.	strana	lalok	subtyp	grade	Nextera	MAF, %	fast	MAF, %
1	53	Ž	P	čelní	anaplastický oligodendrogliom	III	IDH2 R172K	56	IDH2 R172K	48
2	30	M	L	čelní	difuzní (fibrilární) astrocytom	II	IDH2 R172M	59	IDH2 R172M	46
3	32	M	L	čelní	difuzní (fibrilární) astrocytom	II	IDH1 R132C	14	IDH1 R132C	13
4	33	Ž	L	čelní	anaplastický astrocytom	III	IDH1 R132C	64	IDH1 R132C	48
5	33	Ž	L	čelní	difuzní (fibrilární) astrocytom	II	IDH1 R132S	35	IDH1 R132S	34
6	33	Ž	L	čelní	difuzní (fibrilární) astrocytom	II	IDH1 R132H	23	IDH1 R132H	29
7	35	M	L	spánkový	diffuzní astrocytom	II	IDH1 R132H	15	IDH1 R132H	35
8	38	M	L	spánkový	difuzní (gemistocytární) astrocytom	II	IDH1 R132H	26	IDH1 R132H	28
9	54	M	L	spánkový	anaplastický oligoastrocytom	III	IDH2 R172K	50	IDH2 R172K	38
10	47	Ž	P	čelní	difuzní astrocytom	II	IDH1 R132H	15	IDH1 R132H	15
11	45	M	P	čelní	glioblastom	IV	NA	-	NA	-
12	53	M	P	spánkový	glioblastom	IV	wt	-	NA	-

Ž – žena, M – muž, wt – wild type, MAF – mutační alelická frakce ve vzorku.

2.2.3.4. Kontrola kvality sekvenovacích metod

Typická NGS assay se skládá z >30 PCR cyklů, která zahrnuje amplifikaci cílené oblasti DNA více než trilionkrát, to je následováno manipulací amplikonů, což vede k obavě z kontaminace a opakovatelnosti výsledků. V Tabulce 7 jsou uvedeny výsledky analýzy různých typů kontrol pro fast IDH

metodu. Pro zvýšení možné kontaminace jsme seřadili vzorky pro zpracování pravidelným střídáním wild type vzorku s negativním nebo pozitivním na IDH1 R132H jak je v Tabulce 7 uvedeno. Jako negativní kontrola byla použita vysoce fragmentovaná (<100 bp) DNA s nízkou koncentrací (~ 1ng / µl) izolovaná z krve; jako negativní kontrola byl vzorek bez DNA (no template), nastavení a zpracování dat byla nastavena standardně. Na základě analýzy nebyla pozorována žádná kontaminace; wild type vzorky obsahoval 0,17 % varianty c.395G>A (n = 6), což se považuje za celkovou chybu způsobenou přípravou knihovny pro sekvenování platformou Illumina²³¹. Co se týče no template/fragmentované DNA, pozorovali jsme v průměru méně než jednu variantu c.395G>A a 3 ready varianty c.395G> A (n = 12). Za předpokladu, že pro zpracování je zapotřebí ≥ 1000 čtení, je kontaminace < 0,3 %. Analýzou byla potvrzena vysoká míra opakovatelnosti a reprodukovatelnosti u vzorku obsahujícího c.395G> A. VAF byl roven 32,1% + - 0,6% (n = 8, průměr + - SD).

Tabulka 7: Kontrola kvality fast IDH assaye, byla použita data ze tří nezávislých běhů. Jako negativní kontrola byla použita ultrazvukově fragmentovaná DNA vyizolovaná z krve s mediánem velikosti fragmentace <100 bp. Do sekvenační knihovny byla přidána kontrola bez templátu (no template) z důvodu sledování kontaminace podle záměny indexu (index hopping) a/nebo kontaminace z předchozího běhu. DNA izolovaná z tkáně gliálního nádoru se známým statusem mutace IDH1/2 byla použita jako pozitivní kontrola a wild type kontrola.

ID běhu	index	vzorek	výsledek (pokud je dostupný)	c.395A počet (R132H)	celkový počet čtení	VAF c.395G>A (R132H)
FR124	i30	neg. kontr. fr. DNA		0	0	NA
FR124	i31	pozitivní kontrola 1	IDH1 R132H	1990	6078	32,7%
FR124	i32	neg. kontr. fr. DNA		1	7	NA
FR124	i33	pozitivní kontrola 1	IDH1 R132H	1695	5294	32,0%
FR124	i35	neg. kontr. fr. DNA		0	0	NA
FR124	i36	pozitivní kontrola 1	IDH1 R132H	1853	5663	32,7%
FR124	i38	wt kontrola 1	wt	5	4258	0,1%
FR124	i41	neg. kontr. fr. DNA		3	4	NA
FR124	i42	pozitivní kontrola 1	wt	2352	7490	31,4%
FR122	i30	wt kontrola 2	wt	7	3569	0,2%
FR122	i32	pozitivní kontrola 1	IDH1 R132H	1290	3994	32,3%
FR122	i36	wt kontrola 2	wt	3	1268	0,2%
FR122	i38	pozitivní kontrola 1	IDH1 R132H	1539	4829	31,9%
FR122	i36	wt kontrola 2	wt	7	4761	0,1%
FR122	i42	pozitivní kontrola 1	IDH1 R132H	1651	5077	32,5%
FR122	i31	neg. kontr. no template		0	15	NA
FR122	i33	neg. kontr. no template		0	0	NA
FR122	i35	neg. kontr. no template		0	0	NA
FR120	i30	neg. kontr. no template		1	5	NA
FR120	i31	neg. kontr. no template		0	7	NA
FR120	i32	neg. kontr. no template		0	0	NA
FR120	i33	neg. kontr. no template		0	1	NA
FR120	i35	neg. kontr. no template		0	0	NA
FR120	i36	pozitivní kontrola 2	IDH1 R132H	5744	14602	0,39
FR120	i38	pozitivní kontrola 1	IDH1 R132H	4702	15031	0,31
FR120	i41	wt kontrola 3	wt	26	17907	0,1%

FR120	i42	wt kontrola 4	wt	18	15300	0,1%
						VAF
						average +- SD
		IDH1 R132H pozitivní kontrola 1 (n=8)		Average c.395A count 2134	Aver. total read count 6131	32,1% ±0,6%
		wt kontroly (n=6)		8	12259	0,17%± 0,04%
		neg. kontrola: ne template/fr. DNA (n=12)		0,2	44199	NA

VAF – frakce alelové varianty/variant allele fraction, NA – nedetekovatelné, SD – standardní odchylka.

2.2.4. Diskuze

Integrace fenotypových a genotypových parametrů do klasifikace nádorů CNS značně zlepšilo diagnózu. Četnost varianty mutace *IDH1* R132H je udávána okolo 90 % (v naší studované populaci byla frekvence 91 %) a právě tuto mutaci lze detekovat imunohistochemických vyšetření²³². IHC detekce varianty *IDH1* R132H byla provedena za pomoci protilátky DIA-H09, u které je udávaná očekávaná míra skutečně pozitivních vzorků okolo 88-99 %. Za předpokladu, že všechny vzorky označené jako *IDH1* R132H pozitivní dle IHC by byly také *IDH1* R132H pozitivní sekvenováním, míra shody metod sekvenování a IHC by byla 94 % (60/64). Kromě zmiňované varianty R132H je známa řada dalších mutací *IDH1*, včetně R132C (jejichž frekvence u pacientů s gliomem je kolem 3 %; v naší studované populaci to bylo 3 %), R132S (frekvence v této práci: 1 %) a R132G a R132L (jejichž udávaná frekvence je v obou případech kolem 1%; v této práci nebyla ani jedna varianta detekována). Varianty *IDH2* jsou méně časté, přičemž R172K byla pozorována u 3 % pacientů s gliomem (3 % v naší studii), R172M (1 % v naší studii), R172W (v naší studii nebyla nalezena) a R172S (v naší studii nebyla nalezena) s frekvencemi přibližně 1 %⁷⁸. Naše data se shodují s již dříve publikovanými výsledky četnosti a frekvence jednotlivých variant mutací *IDH* u gliomů.

Status *IDH1* je zásadní pro diagnostiku a výběr vhodné strategie léčby. Prvním krokem při léčbě gliomu je obvykle provedení bezpečné radikální resekce, která poskytne dostatečné množství nádorové tkáně pro spolehlivou diagnostiku. Bez ohledu na grade nádoru by mělo být pohlíženo na *IDH* wild type gliomy jako na glioblastom a měly by být léčeny agresivní chemoradioterapií podle Stuppova protokolu. Léčba gliomů exprimujících mutované varianty *IDH* by se měla řídit dle klinických a molekulárních markerů. U radikálně resekováných nádorů nízkého gradu, které vykazují jak kodelecii 1p /19q, tak mutaci *IDH*, lze dokonce uvažovat o úplném vynechání onkoterapie a pouze doporučit sledování stavu pacienta²³³.

Jak je uvedeno výše, přesné určení statusu *IDH* je nesmírně důležité pro výběr efektivní léčebné strategie a určení prognózy pacientů s difuzním gliomem. Finanční zátěž diagnostiky gliomů vzrůstá z důvodu složitosti a velkého množství laboratorních metod. WHO doporučuje testování všech IHC *IDH* negativních vzorků pacientů mladších 55 let, což v naší studii čítá 63 pacientů z 275 (23 %). Naše studie také zahrnovala 4 vzorky z 12, u nichž bylo prokázáno, že jsou dle sekvenace *IDH1* R132H pozitivní. Tyto výsledky naznačují, že dochází k úspoře více než dvou třetin nákladů a s přiměřenou účinností jsou odhaleny méně časté mutace a falešné negativní vzorky. Tyto údaje potvrzují, že je vhodné doplnit standardní IHC metodu o genetické sekvenování k potvrzení výsledků a minimalizaci rizika falešně

negativních vzorků. Pomocí dvou různých molekulárních přístupů sekvenace byla potvrzena vysoká frekvence variant *IDH1* u pacientů s gliomem mladších 55 let.

Imunohistochemické určení mutace *IDH1* R132H selhalo u 11/275 (4 %) vzorků v naší kohortě, což mohlo být způsobeno chybou v laboratorním postupu nebo nevhodným zpracováním tkáně. Z tohoto důvodu je vhodné integrovat druhý kontrolní bod, kterým je sekvenace stěžejních genů zapojených do molekulárně histologické definice gliomů. Tento dvoustupňový postup lze použít také pro další geny vyšetřované u gliomů, jako je alfa-talasemie/syndrom mentální retardace vázaný na X (*ATRX*) nebo telomerázová reverzní transkriptáza (*TERT*).

Na základě současné klasifikace nádorů CNS a rozvoje masivně paralelního sekvenování, je vhodné využívat genové panely vyrobené na míru pro pochopení molekulárního pozadí u gliomů^{234,235}. Prokázali jsme, že přesnost informací v klinice gliomů se zvyšuje dokonce pouze testováním genů *IDH1* a *IDH2*. Naše metoda fast IDH MPS vykazuje shodné výsledky s Nextera XT metodou. Příprava knihovny Fast IDH zahrnuje pouze jeden krok (PCR amplifikace s purifikací, celkem přibližně 3 hodiny), narozdíl od metody Nextera XT (1. PCR amplifikace s purifikací, 2. tagmentace a 3. indexování PCR amplifikace s purifikací, celkem přibližně 7 hodin), snižuje se i pravděpodobnost technické chybovosti a je zredukována doba potřebná k provedení metody. Celkově metoda fast IDH poskytuje vyšší nákladovou efektivitu díky rychlejšímu zpracování vzorků a bude brzy licencována k prodeji. Vzhledem k vysokým nákladům na sekvenační chemii jsme v naší laboratoři použili nejmenší průtokovou kyvetu (MiSEQ nano) s cenou 380 - 500 eur pro dosažení nákladové efektivity metody. Co se týče rutinní diagnostiky, obvykle se sekvenují 2-4 vzorky pro vyšetření mutací *IDH1/2* v jednom běhu (jednou týdně nebo každý druhý týden). Proto je nezbytné kombinovat sekvenování *IDH1/2* i se sekvenováním dalších genů, jako jsou *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* (rakovina tlustého střeva), *EGFR* a *BRAF* (rakovina plic) nebo *BRCA1/2* (rakovina vaječníků a prsu). Při sekvenování 16 vzorků je cena sekvenování u obou metod přibližně 30 eur za vzorek. Náklady na přípravu knihovny, pracovní náklady a provozní náklady tvoří přibližně polovinu celkových nákladů (15 eur). Příprava knihovny pomocí NexteraXT stojí kolem 50 EUR za vzorek. Jakmile bude fast IDH kit komerčně dostupný, očekávané náklady na vzorek budou 30 - 60 eur. Celkové náklady na sekvenování *IDH1/2* by dnes byly asi 100 eur nebo dokonce méně. Což vede k otázce nad současnou platností modelu publikovaného DeWitt z roku 2017⁸⁷, který je založen na nákladech za NGS čítajících 1800 USD (~ 1500 eur). I když by to mohlo znít kontroverzně, předpokládáme, že by měly být v dnešní době analyzovány pomocí MPS i nádory pacientů starších 55 let a postupně by mohlo NGS zcela nahradit imunohistochemické vyšetření IDH IHC. Jediným limitem naší práce může být fakt, že jsme v naší práci nesekvenovali IHC wild type vzorky pacientů starších 55 let pro odhalení nekanonických mutací nebo falešně negativních vzorků.

2.2.5. Závěr

Přesné určení difúzních gliomů je zásadní pro identifikaci vhodné terapie. Gliomy jsou klasifikovány pomocí WHO klasifikace nádorů CNS z roku 2016, který je založen na přítomnosti validovaných biomarkerů zahrnujících mutace *IDH* a kódelecí 1p/19q. Prokázali jsme, že vzácné varianty *IDH1/2* se vyskytují u pacientů s nádory CNS, což potvrzuje předchozí objevy. Naše laboratoř provádí sekvenování DNA nádorů označených jako IHC *IDH1*-negativní u pacientů mladších 55 let a tento postup doporučujeme i dalším laboratořím, které mají za cíl přesnou molekulární diagnostiku.

2.2.6. Podíl autora dizertační práce na daném tématu

Uvedená studie je publikována v časopise Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology pod názvem IDH1/2 mutations in Czech patients with diffuse gliomas: a single centre retrospective massively parallel sequencing analysis (viz Přílohy). Autorka se podílela na designu a koordinaci studie včetně provedení vyšetření všech vzorků pomocí sekvenování a FISH. Zpracovala výsledky a následně rukopis studie.

2.3. Vliv genových aberací na přežití u pacientů s resekováným glioblastomem *IDH* wild type z jednoho centra

2.3.1. Úvod

Glioblastom (GBM) je vysoce invazivní typ nádoru, který není možné kompletně resekovat^{9,236,237}. Z tohoto důvodu mají pacienti s GBM špatnou prognózu s mediánem přežití okolo 12 měsíců. Za rizikové faktory rozvoje gliomu jsou považovány pokročilý věk, mužské pohlaví, europoidní rasa, expozice ionizujícího záření a kouření^{65,238}. Naopak klinické faktory jako jsou nižší věk, performance status, maximální celková resekce a adjuvantní léčba jsou spojovány s lepší prognózou u neselektovaných pacientů s GBM^{239–242}.

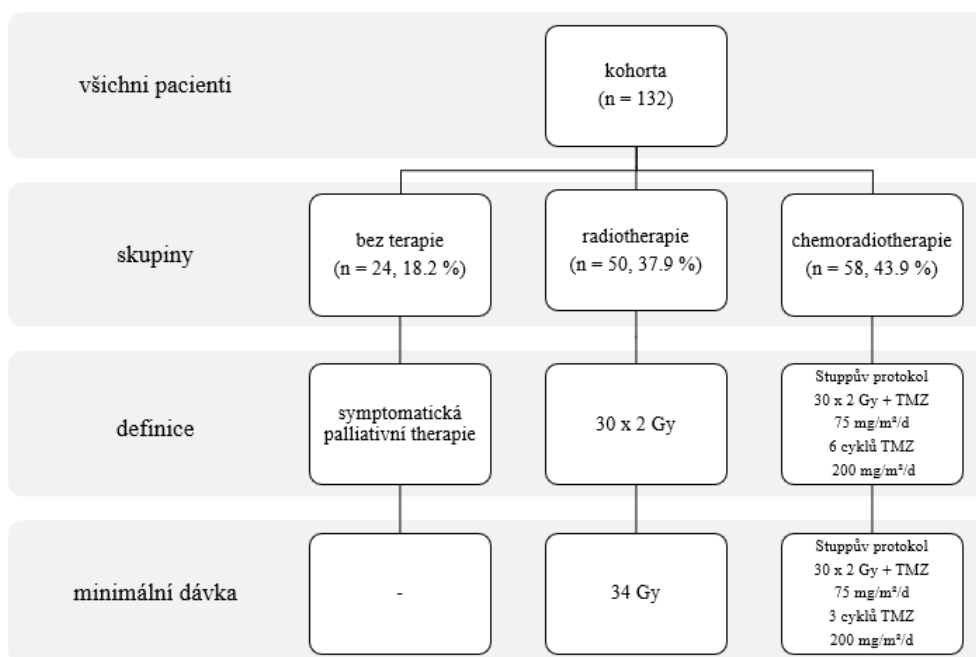
Glioblastomy mohou být klasifikovány na základě statusu *IDH*. GBM s wild type (wt) *IDH* jsou charakterizovány mutacemi v *TP53*, *PTEN* a/nebo kompletní ztrátou chromozomu 10, homozygotními delecemi *CDKN2A/CDKN2B*, mutacemi nebo přemírou exprese *EGFR* a/nebo navýšením počtu chromozomového raménka 7p, mutacemi *PDGFRA1*, mutacemi *NF1*, amplifikací *MDM2* a metylací promotoru *MGMT*²⁴³.

Předmětem této populační studie z jednoho centra bylo určit vliv vybraných genetických aberací a klinických faktorů na přežití u resekováných pacientů s GBM *IDH* wt, kteří byli po resekcí léčeni různými způsoby. Klinické postupy vycházející z klasifikace WHO z roku 2007 byly updatovány dle současných doporučení klasifikace WHO založené na statusu *IDH* z roku 2016^{41,87}.

2.3.2. Materiál a metodika

2.3.2.1. Pacienti

Informace o všech pacientech s gliomy léčených ve Fakultní nemocnici Olomouc, Česká republika, byly sbírány prospektivně a systematicky od roku 2006. Tato práce je zaměřena na supratentoriální GBM *IDH* wild type u dospělých pacientů, kteří podstoupili resekcii a onkoterapii v období mezi červnem 2006 a červnem 2015. Informace o klinickém statusu pacientů (KS, PS WHO a status kouření) byly sbírány spolu s daty ze zobrazovacích metod, histologie a cytogenetických aberací nádorů. Všichni pacienti podstoupili brzkou post-operativní magnetickou rezonanci (do 72hodin) ke stanovení radikality resekce. Devatenáct pacientů bylo reoperováno v průběhu jednoho týdne od první operace. Odstranění více než 80 % nádoru bylo v této studii považováno za nejnižší možný resekováný objem nádoru^{244,245}. Na základě poloautomatické MRI analýze byla stanovena míra resekce v rozmezí 84 % - 100 % s mediánem čítajícím 85,6 %. Medián postoperativního objemu bylo 2,9 ml. Cílem bylo každého pacienta léčit standardní agresivní onkoterapií, avšak pouze část pacientů byla schopna podstoupit Stuppův protokol. Velké množství pacientů progradovalo už před nebo v průběhu počáteční fáze onkoterapie. Pacienti byli celkem rozděleni do tří skupin: bez terapie, s chemoradioterapií a v semipaliativním režimu se samotnou radioterapií v rozmezí 34 – 60 Gy²⁴⁶. Stratifikace kohorty založené na aplikovaném onkologickém režimu je uvedena na Obrázku 9. Po resekcii následovala periodická kontrola provedená každé 3 měsíce pomocí magnetické rezonance až do smrti pacienta.



Obrázek 9: Stratifikace kohorty pacientů založená na léčebné modalitě spolu s detaily u aplikované léčby.

Vzorky nádorové tkáně byly sbírány jak FFPE, tak v čerstvě zmražené formě (-80 °C). Klinický stav a informace o kontrole pomocí magnetické rezonance byly sbírány v pravidelných tříměsíčních intervalech. Status kouření byl získán z preoperačního dotazníku. Pacienti byli klasifikováni jako nekuřáci (83/132 = 62,9 %) za předpokladu, že nikdy nekouřili nebo přestali kouřit před pěti lety od diagnózy; zbylí pacienti (49/132 = 37,1 %) byli označeni jako kuřáci. Všechny nádory byly klasifikovány dvěma lokálními patologiemi dle nejnovější WHO klasifikace nádorů CNS. Imunohistochemická analýza *IDH1* R132H a *Ki67* byla zahrnuta do standardní procedury klasifikace. Všichni pacienti podepsali formulář o informovaném souhlasu.

2.3.2.2. Imunohistochemické stanovení statusu *IDH1* R132H

Kohorta byla složená z pacientů s GBM se statutem *IDH* wild type dle diagnostických kritérií WHO 2016. Tkáňové řezy o tloušťce 1-2 μm ošetřeny za použití PT link system (Agilent) při teplotě 97 °C, pH 9 po dobu 20 min pro odkrytí epitopu. Peroxid vodíku byl použit na blokování endogenní peroxidázové aktivity. Řezy byly následně ošetřeny primární protilátkou Anti-*IDH1*R132H klon H09 (Dianova, Hamburg, Německo) v ředícím poměru 1:100 po dobu 20 min při pokojové teplotě. EnVision Flex+, Mouse, High pH (Agilent DAKO) bylo použito k amplifikaci signálu primární protilátky. Řezy byly poté ošetřeny na 20 min sekundární protilátkou, EnVision Flex/HRP (Agilent DAKO) a pro vizualizaci byl použito DAB+ Substrate Chromogen System (Agilent DAKO).

2.3.2.3. Imunohistochemické vyšetření statusu *Ki67*

Tkáňové řezy o tloušťce 1-2 μm byly tepelně indukované k odmaskování epitopu pomocí citrátového pufru (pH 6) po dobu 10 min při 120 °C. Peroxid vodíku byl použit na blokování endogenní peroxidázové aktivity (myší/králičí ImmunoDetector DAB HRP Brown System, Bio SB). Řezy byly následně ošetřeny

po dobu 30 min primárními protilátkou, Ki67, klon MIB-1 (Agilent DAKO), ředění 1:200. Poté následovalo značení sekundární protilátkou (myší/králičí ImmunoDetector DAB HRP Brown System, Bio SB) po dobu 30 min, reakce byla vizualizována pomocí DAB+ Substrate Chromogen.

2.3.2.4. Genotypizace *IDH1* R132 a *IDH2* R172

DNA byla vyizolována pomocí Roche Cobas® kitu a Cobas® DNA sample preparation kitu dle instrukcí výrobce. qPCR amplifikace byla provedena pomocí celkové DNA o objemu 1 µl nebo 5 µl (v závislosti na DNA koncentraci, > 30 ng/µl nebo > 10 ng/µl) s Thermo-Start Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, 1U), 10X PCR Thermo-Start Buffer (ThermoFisher Scientific), MgCl₂ (ThermoFisher Scientific), dNTPs (Bioline) a EvaGreen 20x (Biotinium). Pro multiplex PCR amplifikaci (*IDH1* a *IDH2* reakce) byly následující podmínky: 95 °C po dobu 2 min 15 s, poté 40 cyklů po 15 s při teplotě 95 °C, 30 s při 62 °C a 30 s při 72 °C (FAM kanál při sledování fluorescence), následované finální inkubací po dobu 5 min při 72 °C a melting křivka od 60 °C do 95 °C při sledování fluorescence FAM kanálem při 0.5 °C. Po amplifikaci následovalo pročištění amplikonů pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Hilden, GER, QIAGEN). Koncentrace produktu byla změřena pomocí Qubit 2.0 HS DNA kit (Invitrogen). Sekvenační knihovna byla zředěna a denaturována 0,1 M NaOH (DNA koncentrace = 10 µM). Knihovna obsahovala přibližně stejná množství každého vzorku. Sekvenování bylo provedeno pomocí Illumina MiSeq platformy využívající the MiSeq V2 Nano 300 bp nebo V3 150 bp sekvenační kit a 2 x 75 bp sequenační ready. Výsledky sekvenací byly analyzovány pomocí Somatic Variant Caller funkce z MiSeq Reporter softwarového balíčku. Získané vcf soubory byly zpracovány pomocí Excel (Microsoft). Mutace *IDH1* a *IDH2* genů byly identifikovány v kodonech 132 a 172 s frekvencí > 5 % a pokrytím >1000.

2.3.2.5. FISH analýza

FISH analýza byla provedena na FFPE tkáních podle návodu výrobce se sondami LSI 1p36.3, LSI 1q25.2, LSI 9p21.3, LSI 19q13, LSI EGFR, LSI CEP7, LSI MDM2, LSI 10p11.1, LSI BCR, LSI 22q12.2, a LSI CCND1 od firmy IntelliMed, Ltd. (Olomouc, Česká republika) spolu se sondami LSI TP53, LSI RB1, a LSI 13q12.11 od firmy Vysis (Downers Grove, IL, USA). Signály byly detekovány a kvantifikovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Minimálně 100 nepřekrývajících se jader bylo vyšetřeno v každém vzorku.

2.3.2.6. Nastavení cut off hodnot počtu kopií

Současné terapeutické protokoly pro gliomy postrádají standardní cut off hodnoty pro molekulární aberace. Z tohoto důvodu byly pro každý marker definovány specifické cut off hodnoty našeho souboru pomocí maxstat funkce (maxstat R package, ver. 0.7-25) a pomocí surv_cutpoint function (survminer R package, ver. 0.4.3) s defaultní hodnotou 0,1 pro minprop parametr (reprezentující minimální velikost pozorování ve skupině) a data na přežití bez progresu (čas a událost). Dvě skupiny pacientů byly definovány pro každý marker: skupina s nízkým počtem kopií (low copy number, LCN) zahrnující počty kopií rovny nebo pod odhadovanou cut off hodnotu, a skupina s vyšším počtem kopií (high copy number, HCN) zahrnující pacienty s počty kopií přesahující cut off hodnotu.

2.3.2.7. MGMT metylační status

Bisulfitová konverze templátové DNA byla provedena pomocí EZ DNA methylation Gold Kit dle návodu výrobce (Zymo research, Irvine, USA) byla provedena ihned po izolaci DNA z tkáně gliomů za pomoci DNA Sample Preparation Kit (Roche, Pleasanton, USA). MGMT metylace byla detekována za pomoci MethyLight real-time metylačně-specifické PCR. Pro kontrolu integrity DNA, kvality bisulfitové konverze a PCR reakce, byla paralelně analyzována metylace E-cadherinu (CDH1), Alu-M5 a komerčním standardem s metylací a bisulfitově-konvertovanou DNA (Zymo Research). Tato kontrola byla provedena zároveň při všech extrakcích z tkáňových vzorků.

Každá PCR reakce o celkovém objemu 10 µl pro detekci promotorové metylace MGMT, E-cadherinu a Alu-M5 obsahovala 1x PCR buffer (QiaGen, Germany), 1 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 U HotStarTaq (QiaGen) a příslušné primery a próby (Tabulka 8). PCR program zahrnoval denaturaci při 95 °C po dobu 15 min poté 40 cyklů při 95 °C po dobu 30 s, 65 °C po dobu 50 s a 72 °C po dobu 60 s.

Tabulka 8: Primery a próby použité k detekci promotorové metylace MGMT, E-cadherin a Alu-M5.

Gen	Primer	DNA sekvence	finální koncentrace (µM)
methylace promotoru MGMT	forward	5'- CGAATATACTAAAACAACCCGCG -3'	1,0
	reverse	5'- GTATTTTTTCGGGAGCGAGGC -3'	1,0
	próba	FAM-BHQ- CAAATCCTCGCGATACGCACCGTTTACG	0,2
methylace promotoru E-cadherin	forward	5'- AATTTTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT -3'	1,0
	reverse	5'- TCCCCAAAACGAAACTAACGAC -3'	1,0
	próba	FAM-BHQ-CGCCACCCGACCTCGCAT	0,2
methylace promotoru Alu-M5	forward	5'- GGTATGATGGCGTATGTTTGT -3'	0,17
	reverse	5'- GACTCACCACAACCTCCAC -3'	0,17
	próba	FAM-BHQ- AAACGATTCTCCTACCTCAACCTCCCGAA	0,03

2.3.2.8. Statistická analýza

Všechny statistické analýzy byly provedeny za pomoci R Statistical Software, Version 4.0.3 (www.r-project.org). Pearson's chi-kvadrát a Fisherův exaktní test byly použity k testování spojitosti mezi molekulárními markery a přežitím pro všechny pacienty a pro pacienty léčenými specifickou léčbou. Celkové přežití (OS) a přežití bez progresu (PFS) bylo spočítáno pomocí Kaplan-Meierovy metodiky (prezentovány jako mediány v tabulkách výsledků). OS bylo počítáno ode dne první operace až do smrti či poslední kontroly. Efekt každého molekulárního markeru na OS a PFS bylo vyšetřováno na základě Coxova modelu proporčních rizik s jedním faktorem (univariátní model) a s adjustací pro hlavní klinické prognostické faktory (multivariátní model, Obrázky 10 a 11), tj. věk v době diagnózy a/nebo (≤ 55 vs. > 55 let) a Karnofského skóre (KS; < 80 vs. ≥ 80) v jednotlivých skupinách. Vliv každého faktoru na OS resp. PFS napříč skupinami bylo vyšetřeno pomocí Coxova modelu proporčních rizik (jeden pro každý marker) stratifikovaný podle terapie a adjustovaný pro kategorie věku a kategorie Karnofského skóre.

2.3.3. Výsledky

2.3.3.1. Základní charakteristika pacientů

Studovaná kohorta se skládala ze 132 pacientů s resekováním GBM IDH wild type. U každého pacienta následovala kontrola s tří měsíčním intervalem až do jeho smrti; medián přežití byl 7,6 měsíce (1,0 –

113,7 měsíců). Tabulka 9 shrnuje charakteristiku pacientů (pohlaví, věk, KS, lokalizace, kouření a adjuvantní terapie) a jejich molekulárně cytogenetické charakteristiky, jmenovitě jejich status počtu kopií (HCN a LCN) s ohledem na studované genetické aberace a status metylace promotoru MGMT.

Tabulka 9: Demografická data pro kohortu pacientů a informace o prevalenci nižšího nebo vyššího počtu kopií studovaných markerů.

characteristika	hladina	bez terapie	RT	CHT+RT	všichni pacienti
pohlaví	Ž	10/24 (41,7%)	25/50 (50%)	17/58 (29,3%)	52/132 (39,4%)
	M	14/24 (58,3%)	25/50 (50%)	41/58 (70,7%)	80/132 (60,6%)
lokalizace GBM	F	8/24 (33,3%)	14/50 (28%)	20/58 (34,5%)	42/132 (31,8%)
	O	3/24 (12,5%)	10/50 (20%)	10/58 (17,2%)	23/132 (17,4%)
	P	2/24 (8,3%)	9/50 (18%)	13/58 (22,4%)	24/132 (18,2%)
	T	10/24 (41,7%)	15/50 (30%)	12/58 (20,7%)	37/132 (28%)
	další	1/24 (4,2%)	2/50 (4%)	3/58 (5,2%)	6/132 (4,5%)
kuřák*	ne	9/24 (37,5%)	33/50 (66%)	41/58 (70,7%)	83/132 (62,9%)
	ano	15/24 (62,5%)	17/50 (34%)	17/58 (29,3%)	49/132 (37,1%)
MGMT	nemetylovaný	16/23 (69,6%)	31/48 (64,6%)	33/52 (63,5%)	80/123 (65%)
	metylovaný	7/23 (30,4%)	17/48 (35,4%)	19/52 (36,5%)	43/123 (35%)
věková kategorie*	<=55	2/24 (8,3%)	2/50 (4%)	19/58 (32,8%)	23/132 (17,4%)
	>55	22/24 (91,7%)	48/50 (96%)	39/58 (67,2%)	109/132 (82,6%)
Karnofského skóre*	0-79	16/24 (66,7%)	18/50 (36%)	12/58 (20,7%)	46/132 (34,8%)
	80-100	8/24 (33,3%)	32/50 (64%)	46/58 (79,3%)	86/132 (65,2%)
<i>Ki67</i>	<= 60	20/24 (83,3%)	41/49 (83,7%)	49/58 (84,5%)	110/131 (84%)
	> 60	4/24 (16,7%)	8/49 (16,3%)	9/58 (15,5%)	21/131 (16%)
1q CN	<= 2,02	5/15 (33,3%)	12/33 (36,4%)	13/39 (33,3%)	30/87 (34,5%)
	> 2,02	10/15 (66,7%)	21/33 (63,6%)	26/39 (66,7%)	57/87 (65,5%)
22q CN	<= 2,48	13/16 (81,2%)	30/39 (76,9%)	33/41 (80,5%)	76/96 (79,2%)
	> 2,48	3/16 (18,8%)	9/39 (23,1%)	8/41 (19,5%)	20/96 (20,8%)
CEP7 CN	<= 2,04	4/16 (25%)	4/41 (9,8%)	10/50 (20%)	18/107 (16,8%)
	> 2,04	12/16 (75%)	37/41 (90,2%)	40/50 (80%)	89/107 (83,2%)
<i>BCR</i> CN	<= 2,04	6/15 (40%)	11/31 (35,5%)	14/39 (35,9%)	31/85 (36,5%)
	> 2,04	9/15 (60%)	20/31 (64,5%)	25/39 (64,1%)	54/85 (63,5%)
<i>EGFR1</i> CN	<= 3,39	6/16 (37,5%)	25/44 (56,8%)	26/53 (49,1%)	57/113 (50,4%)
	> 3,39	10/16 (62,5%)	19/44 (43,2%)	27/53 (50,9%)	56/113 (49,6%)
9p21.3 CN	<= 1,86	6/17 (35,3%)	10/41 (24,4%)	16/49 (32,7%)	32/107 (29,9%)
	> 1,86	11/17 (64,7%)	31/41 (75,6%)	33/49 (67,3%)	75/107 (70,1%)
1p36.3 CN	<= 2,13	12/20 (60%)	29/45 (64,4%)	43/52 (82,7%)	84/117 (71,8%)
	> 2,13	8/20 (40%)	16/45 (35,6%)	9/52 (17,3%)	33/117 (28,2%)
13q12.11 CN	<= 2,01	3/10 (30%)	6/31 (19,4%)	14/41 (34,1%)	23/82 (28%)
	> 2,01	7/10 (70%)	25/31 (80,6%)	27/41 (65,9%)	59/82 (72%)
<i>RB1</i> CN	<= 2,26	14/16 (87,5%)	37/42 (88,1%)	42/49 (85,7%)	93/107 (86,9%)
	> 2,26	2/16 (12,5%)	5/42 (11,9%)	7/49 (14,3%)	14/107 (13,1%)
<i>P53</i> CN	<= 2,42	14/18 (77,8%)	38/44 (86,4%)	41/52 (78,8%)	93/114 (81,6%)
	> 2,42	4/18 (22,2%)	6/44 (13,6%)	11/52 (21,2%)	21/114 (18,4%)
10p11.1	<= 2,11	13/14 (92,9%)	33/36 (91,7%)	35/47 (74,5%)	81/97 (83,5%)
	> 2,11	1/14 (7,1%)	3/36 (8,3%)	12/47 (25,5%)	16/97 (16,5%)
19q13 CN	<= 1,83	2/18 (11,1%)	4/43 (9,3%)	4/53 (7,5%)	10/114 (8,8%)
	> 1,83	16/18 (88,9%)	39/43 (90,7%)	49/53 (92,5%)	104/114 (91,2%)
<i>MDM2</i> CN	<= 1,97	1/17 (5,9%)	5/42 (11,9%)	3/51 (5,9%)	9/110 (8,2%)
	> 1,97	16/17 (94,1%)	37/42 (88,1%)	48/51 (94,1%)	101/110 (91,8%)
<i>CCND1</i> CN	<= 2,48	12/14 (85,7%)	29/32 (90,6%)	40/47 (85,1%)	81/93 (87,1%)
	> 2,48	2/14 (14,3%)	3/32 (9,4%)	7/47 (14,9%)	12/93 (12,9%)

*test nezávislosti (chi-kvadrát nebo Fisherův exaktní test), p-hodnota < 0,05; RT – radioterapie; CHT+RT – chemoradioterapie; Ž – žena; M – muž; F – frontální; O – okcipitální; P – parietální; T – temporální; *BCR* – *breakpoint cluster region protein*; *EGFR1* – receptor epidermálního růstového faktoru; *RB1* – retinoblastoma 1; *TP53* – *tumor protein P53*; *MDM2* – *mouse double minute 2 homolog*; *CCND1* – *cyclin D1*; *MGMT* – *O6-methylguanin-DNA metyltransferáza*.

2.3.3.2. Pacienti GBM *IDH* wild type léčeni chemoradioterapií

Multivariátní analýza odhalila signifikantní spojitost mezi pohlavím a přežitím u pacientů léčených chemoradioterapií. Mužské pohlaví, Karnofského skóre a věková kategorie měli negativní dopad na PFS (HR = 1,9; p = 0,046) a OS (HR = 2,1; p = 0,03).

Vysoká exprese Ki67 byla spojena s kratším OS (medián = 7,9 měsíců vs. 15 měsíců pro nízkou expresi Ki67; HR = 2,9, p = 0,005) a PFS (medián = 4,4 měsíce vs. 9,6 měsíce pro nízkou expresi Ki67; HR = 4,5, p = < 0,001) ve skupině léčené chemoradioterapií. Stejný efekt byl pozorován v případě Coxova modelu pro kategorizovaný věk a Karnofského skóre (HR(OS) = 3,2; p = 0,003; HR(PFS) = 4,8; p = < 0,001).

Dále měli pacienti s 22q12.2 HCN kratší PFS než pacienti s LCN (medián = 6,1 měsíců vs. 9,7 měsíců; p = 0,006), což bylo potvrzeno i multivariátní analýzou (HR = 4,8; p = 0,002). Multivariátní analýza adjustovaná pro věk a Karnofského skóre navíc prokázala vliv 22q12.2 HCN na kratší OS (HR = 2,6; p = 0,033).

CCND1 HCN predikuje delší PFS u skupiny pacientů léčených chemoradioterapií (medián = 13,3 měsíců vs. 6,9 měsíců u pacientů s *CCND1* LCN; p = 0,015) a dále byl spojován se sníženým relativním rizikem (HR = 0,3; p = 0,011). *CCND1* HCN byl také spojen s delším OS (medián = 18,9 měsíců vs. 13,6 měsíců pro pacienty s *CCND1* LCN; p = 0,029), což bylo i potvrzeno nižším relativním rizikem (HR = 0,3; p = 0,026).

19q13 HCN status byl spojen s delším PFS (medián = 8,9 měsíců vs. 5,5 měsíců pro pacienty s 19q13 LCN; p = 0,037) a nižším relativním rizikem (HR = 0,3; p = 0,025).

MDM2 HCN status byl signifikantně spojen s delším PFS (medián = 8,8 měsíců vs. 3,9 měsíce u pacientů s *MDM2* LCN; p < 0,001) a OS (medián = 14,8 měsíců vs. 5,2 u pacientů s *MDM2* LCN; p < 0,001) ve skupině pacientů léčených chemoradioterapií. Tento závěr byl potvrzen i multivariátní analýzou, kde byla relativní rizika *MDM2* snížena jak u PFS (HR = 0,1; p = 0,002) tak u OS (HR = 0,1; p = 0,003).

Nakonec *p53* HCN bylo signifikantně spojeno s delším OS (medián = 18,9 měsíců vs. 13,6 u pacientů s *p53* LCN; p = 0,032) ve skupině pacientů léčených chemoradioterapií, avšak tento závěr nebyl potvrzen multivariátní analýzou. Multivariátní analýza ale potvrdila možné spojení mezi *RB1* HCN a PFS (HR = 2,8; p = 0,026) u této skupiny pacientů.

2.3.3.3. Pacienti GBM *IDH* wild type léčeni radioterapií

Signifikantní snížení OS bylo nalezeno u 1q HCN (medián = 3,9 měsíce vs. 8,9 měsíců u pacientů s 1q LCN; p = 0,022) i u PFS (medián = 2,7 měsíce vs. 4,6 měsíců u 1q LCN patients; p = 0,019) což potvrzují i relativní rizika multivariátního modelu u obou parametrů - OS (HR = 2,7; p = 0,022) a PFS (HR = 4,2; p = 0,01) ve skupině pacientů léčených radioterapií.

22q12.2 HCN byl označen jako negativní prognostický faktor PFS (medián = 2,3 měsíce vs. 3,6 u pacientů s 22q12.2 LCN ; p = 0,042). Multivariátní model pro tento marker také potvrdil nižší relativní riziko (HR=2,4; p = 0,038).

BCR HCN má prokazatelně vliv na kratší OS (medián = 5,3 měsíců vs. 8,5 měsíců u pacientů s *BCR* LCN; p = 0,039), což bylo i potvrzeno multivariátní analýzou (HR = 2,4; p = 0,042).

RB1 HCN bylo spojeno s kratším OS (medián = 3,6 měsíce vs. 6,9 u pacientů s *RB1* LCN; p = 0,012) a tato spojitost byla potvrzena i odhadem relativního rizika (HR = 3,8; p = 0,013).

2.3.3.4. Pacienti GBM *IDH wt* bez terapie

Protože tato skupina pacientů bez léčby obsahovala pouze 24 subjektů, některé parametry nebylo možné vyhodnotit. I přesto bylo v této skupině mužské pohlaví spojeno s kratším PFS (medián = 0,6 měsíce vs. 1,7 měsíce u žen; p = 0,015), což bylo potvrzeno i vyšším odhadem relativních rizik (HR = 5,7; p = 0,02).

Status kouření byl také spojen s kratším PFS pacientů bez terapie (medián = 0,7 vs. 1,8 měsíce pro nekuřáky; p = 0,036), což bohužel multivariátní analýza nepotvrdila.

CCND1 HCN bylo spojeno s kratším OS (medián = 1,3 vs. 3,1 měsíců u pacientů s *CCND1*; p = 0,043) ve skupině neléčených pacientů se značně vyšším odhadem relativních rizik (HR = 12,8; p = 0,049). Avšak spolehlivost těchto výsledků je limitována nízkým počtem případů.

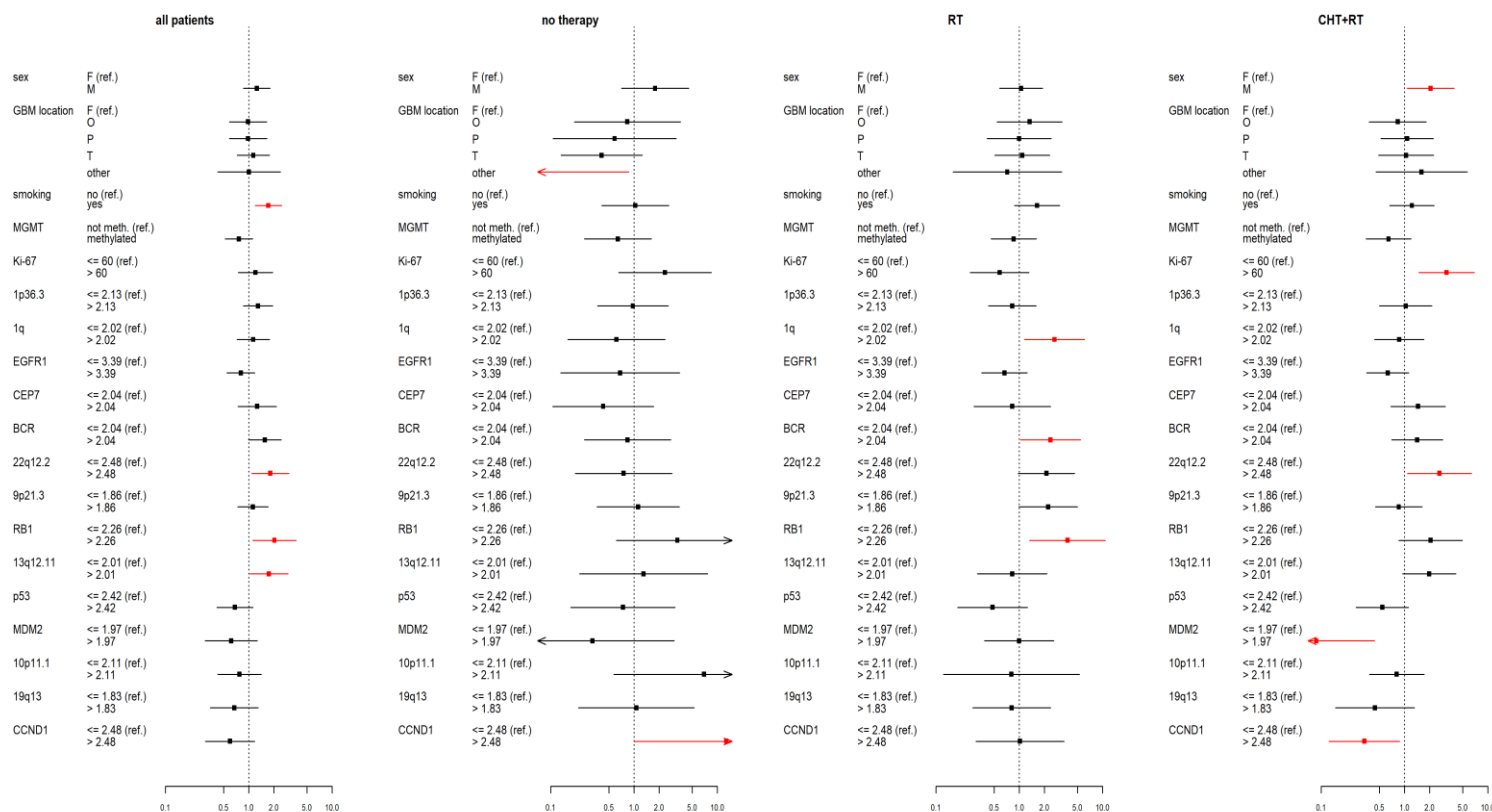
2.3.3.5. Statistická data celé kohorty GBM *IDH wt*

Pro zjištění vlivu každého faktoru na OS popřípadě na PFS napříč všemi skupinami byl aplikován Coxův model stratifikovaný podle typu aplikované terapie a adjustovaný pro kategorie věku a Karnofského skóre, výsledky jsou uvedeny v Tabulce 10. Výsledky odhalily vyšší odhad relativního rizika pro mužské pohlaví (HR = 1,6; p = 0,029). *RB1* HCN se jeví jako negativní faktor jak pro OS (HR = 2,5; p = 0,003) tak pro PFS (HR = 2,6; p = 0,006). *CCND1* HCN bylo spojeno s nižším HR (HR = 0,4; p = 0,034) a stejný efekt byl pozorován i u 19q13 HCN (HR = 0,4; p = 0,012). Kratší OS (HR = 0,6; p = 0,024) a PFS (HR = 0,6; p = 0,007) bylo pozorováno u pacientů s *EGFR1* HCN. Co se týče efektu *P53* HCN, došlo u těchto pacientů ke zkrácení OS (HR = 0,5; p = 0,019) i PFS (HR = 0,5; p = 0,02).

Tabulka 10: Výsledky stratifikovaného Coxova proporčního modelu rizik pro OS resp. PFS pro vybrané klinické faktory a molekulární markery adjustované pro kategorie Karnofského skóre a věku. Pro každý model a kategorii je uveden odhad relativních rizik (bodový odhad i 95% interval spolehlivosti) a p hodnota. Sloupec N představuje počet pacientů v každé hladině faktoru u podskupin. Výsledky pro adjustované faktory nejsou uvedeny.

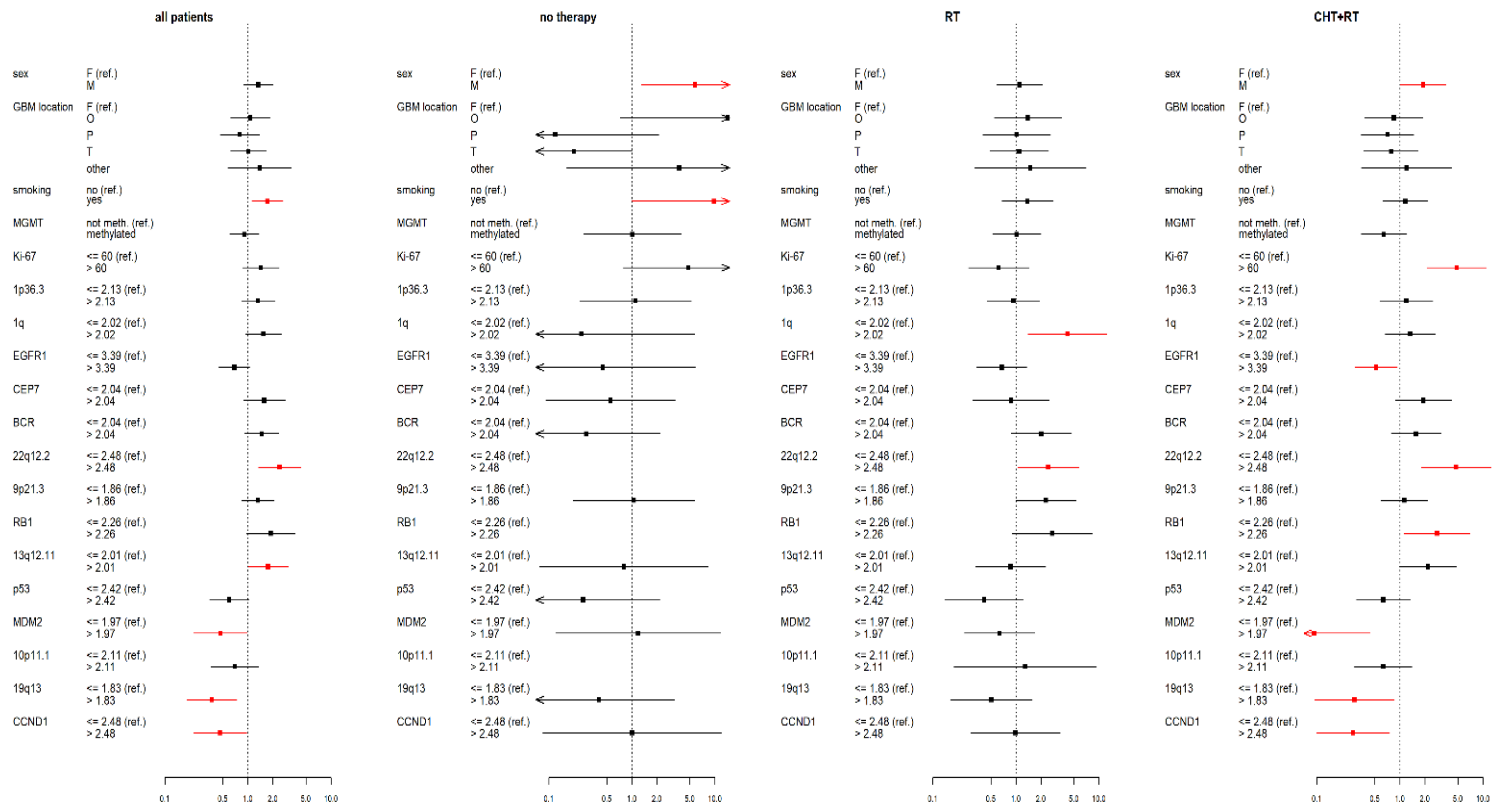
		OS			PFS		
		N	HR (95%CI)	p-hodnota	N	HR (95%CI)	p-hodnota
pohlaví	F	52			45		
	M	80	1,4 (1; 2)	0,088	71	1,6 (1; 2,4)	0,029
lokalizace	F	42			37		
	O	23	1 (0,6; 1,7)	0,953	21	1,1 (0,6; 1,9)	0,71

	P	24	1 (0,6; 1,7)	0,979	22	0,8 (0,5; 1,4)	0,446
	T	37	0,9 (0,5; 1,4)	0,601	30	0,8 (0,5; 1,3)	0,319
	jiné	6	0,9 (0,4; 2,1)	0,752	6	1,3 (0,5; 3,2)	0,528
kouření	no	83			78		
	yes	49	1,3 (0,9; 1,9)	0,165	38	1,4 (0,9; 2,2)	0,106
<i>MGMT</i>	metylovaný	80			68		
	nemetylovaný	43	0,7 (0,5; 1)	0,079	40	0,8 (0,6; 1,3)	0,401
<i>Ki-67</i>	<= 60	110			97		
	> 60	21	1,2 (0,7; 2)	0,502	19	1,4 (0,8; 2,4)	0,214
1p36.3	<= 2,13	84			77		
	> 2,13	33	0,9 (0,6; 1,4)	0,623	25	1,1 (0,7; 1,7)	0,792
1q	<= 2,02	30			25		
	> 2,02	57	1,2 (0,7; 1,9)	0,47	50	1,7 (1; 2,9)	0,056
<i>EGFR1</i>	<= 3,39	57			52		
	> 3,39	56	0,6 (0,4; 0,9)	0,024	50	0,6 (0,4; 0,8)	0,007
CEP7	<= 2,04	18			16		
	> 2,04	89	1,1 (0,6; 1,8)	0,828	80	1,4 (0,8; 2,6)	0,244
<i>BCR</i>	<= 2,04	31			30		
	> 2,04	54	1,6 (1; 2,6)	0,053	45	1,5 (0,9; 2,5)	0,095
22q12.2	<= 2,48	76			67		
	> 2,48	20	1,7 (1; 2,8)	0,052	17	2,2 (1,2; 4,1)	0,009
9p21.3	<= 1,86	32			28		
	> 1,86	75	1,3 (0,8; 2)	0,236	67	1,5 (0,9; 2,4)	0,091
<i>RB1</i>	<= 2,26	93			85		
	> 2,26	14	2,5 (1,4; 4,7)	0,003	11	2,6 (1,3; 5,2)	0,006
13q12.11	<= 2,01	23			23		
	> 2,01	59	1,5 (0,9; 2,6)	0,138	53	1,5 (0,8; 2,7)	0,165
<i>p53</i>	<= 2,42	93			84		
	> 2,42	21	0,5 (0,3; 0,9)	0,019	18	0,5 (0,3; 0,9)	0,02
<i>MDM2</i>	<= 1,97	9			9		
	> 1,97	101	0,6 (0,3; 1,3)	0,186	89	0,5 (0,3; 1,1)	0,111
10p11.1	<= 2,11	81			72		
	> 2,11	16	0,8 (0,4; 1,5)	0,522	15	0,7 (0,4; 1,4)	0,337
19q13	<= 1,83	10			10		
	> 1,83	104	0,8 (0,4; 1,5)	0,465	90	0,4 (0,2; 0,8)	0,012
<i>CCND1</i>	<= 2,48	81			74		
	> 2,48	12	0,6 (0,3; 1,2)	0,178	11	0,4 (0,2; 0,9)	0,034



Obrázek 10: Výsledky multivariátního Coxova modelu proporrčních rizik pro OS u studovaných proměnných (vybrané klinické faktory a molekulární markery) ve skupinách dle terapie, vyjádřeno poměrem rizik (bod – bodový odhad, úsečka koresponduje s 95 % intervalem spolehlivost; v případě většího intervalu je použita šipka) pro každou hladinu uvedených faktorů. Referenční kategorie je označena jako “(ref.)”. Každý faktor byl analyzován v separátním modelu s adjustací na kategorie věku a Karnofského skóre. Signifikantní výsledky ($p < 0.05$) jsou vyznačeny červeně; tečkovaná linie označuje poměr rizik roven 1.

RT – radiotherapie; CHT+RT – chemoradiotherapie; F – ženy; M – muži; F – frontální; O – okcipitální; P – parietální; T – temporální; BCR – breakpoint cluster region; EGFR1 – receptor epidermálního růstového faktoru 1; RB1 – retinoblastoma gene 1; TP53 - tumor protein P53; MDM2 – mouse double minute 2 homolog; CCND1 – cyclin D1; MGMT - O6-metylguanin-DNA methyltransferáza.



Obrázek 11: Výsledky multivariátního Coxova modelu propočinných rizik pro PFS u studovaných proměnných (vybrané klinické faktory a molekulární markery) ve skupinách dle terapie, vyjádřeno poměrem rizik (bod – bodový odhad, úsečka koresponduje s 95 % intervalem spolehlivosti; v případě většího intervalu je použita šipka) pro každou hladinu uvedených faktorů. Referenční kategorie je označena jako “(ref.)”. Každý faktor byl analyzován v separátním modelu s adjustací na kategorie věku a Karnofského skóre. Signifikantní výsledky ($p < 0.05$) jsou vyznačeny červeně; tečkovaná linie označuje poměr rizik roven 1.

RT – radioterapie; CHT+RT – chemoradioterapie; F – ženy; M – muži; F – frontální; O – okcipitální; P – parietální; T – temporální; BCR – breakpoint cluster region; EGFR1 – receptor epidermálního růstového faktoru 1; RB1 – retinoblastoma gene 1; TP53 - tumor protein P53; MDM2 – mouse double minute 2 homolog; CCND1 – cyclin D1; MGMT - O6-metylguanin-DNA methyltransferáza.

2.3.3.6. Shrnutí výsledků

Ve skupině pacientů léčených radioterapií byly nalezeny výrazné prognosticky negativní faktory pro OS jakými jsou 1q HCN, *BCR* HCN a *RB1* HCN, co se týče negativních prognostických faktorů PFS se jedná o 1q HCN a 22q12.2 HCN.

Ve skupině pacientů léčených chemoradioterapií bylo jako negativními klinickými faktory označeno mužské pohlaví, vysoké Karnofského skóre, vyšší věk, vyšší exprese Ki67 a status 22q12.2 HCN. Naopak genetické markery jako *CCND1* HCN, 19q13 HCN, *MDM2* HCN a *P53* HCN byly potvrzeny jako pozitivní markery jak OS tak PFS.

I přes malý soubor pacientů bez terapie se zdá, že mužské pohlaví, status kouření a *CCND1* HCN mají negativní vliv na prognózu.

V případě celé kohorty pacientů byly označeny za negativní prognostické faktory mužské pohlaví, *RB1* HCN a 22q12.2 HCN. Naopak status *EGFR1* HCN, *P53* HCN, *CCND1* HCN a 19q13 HCN se jeví jako pozitivní prognostické faktory.

2.3.4. Diskuze

I přes značnou snahu odhalit molekulární podstatu GBM, zůstávají role známých klíčových genů a molekulárních markerů nejasné^{247–249}. Předchozí studie se snažily najít rozdílné molekulární znaky u difuzních gliomů a tím odhalit klinicky relevantní a funkčně rozdílné podskupiny GBM, které však nenašly uplatnění v klinické praxi^{250–254}. Dalším problémem jsou nejednoznačné vlivy genetických aberací uvedené napříč literaturou. Navíc většina studií zahrnuje pacienty, kteří podstoupili jak biopsii tak resekci^{239,255–258}, zatímco naše studie je zaměřena pouze na pacienty s radikální resekci. To by mělo zredukovat heterogenitu a pomoci odhalit efekt specifických genetických faktorů. Analýza informací od pacientů s GBM naznačuje, že hlavním důvodem pro léčbu bez radioterapie byl špatný neurologický status (KS < 60) po operaci. Indikace pro samotnou radioterapii a přerušení předběžné chemoradioterapie byl špatný neurologický status (KS ≈ 60) po operaci a rychlé klinické zhoršení během onkoterapie. Z důvodu malé skupiny pacientů bez onkologické léčby (n=24) nebyla dostatečně provedena multivariátní analýza a tudíž nebylo možné spočítat odhad relativních rizik pro OS a PFS.

Nejlepší outcome pacientů s glioblastomem byl sledován při agresivní multimodální terapii zahrnující bezpečnou a maximální resekci následovanou chemoradioterapií²⁵⁹. U studované kohorty byl každý pacient s resekci znovu evaluován pro určení nejhodnější onkoterapie.

Pacienti s GBM bez onkologické léčby nebo léčení pouze radioterapií mají špatnou prognózu a je u nich pozorován rychlý růst nádoru²⁶⁰. Na základě naší statistické analýzy bylo odhaleno pouze malé množství pozitivních prognostických faktorů u skupiny bez onkoterapie. Proto jsme dospěli k závěru, je vhodné aplikovat adjuvantní terapii, která by zajistila zpomalení progresu nádoru. I pro tyto pacienty by bylo vhodné najít novou léčebnou strategii.

Hlavní cílem většiny zveřejněných studií o GBM bylo identifikovat klinicky relevantní biomarkery s potencialem aplikací v klinické praxi jako tomu je právě u *IDH*⁴¹. Tato práce byla zaměřena na

vybrané genetické markery u pacientů s GBM *IDH* wt a cílem bylo odhalit jejich vliv na vývoj onemocnění a na léčbu.

CCND1 HCN se jeví jako jasný pozitivní marker pro OS a PFS ve skupině pacientů léčených chemoradioterapií, avšak opačný efekt byl pozorován u pacientů bez chemoterapie i radioterapie. To může být dáno zvýšenou chemosenzitivitou u nádorů s vyšší expresí tohoto genu²⁶¹. *CCND1* gen reguluje přechod buněčného cyklu z G1 do S fáze a je tedy zapojen do proliferace a diferenciaci¹⁸³.

Zvýšená exprese *MDM2* blokuje aktivitu p53, což vede k nekontrolovatelné proliferaci a vzniku nádoru mozku. Kupodivu z našich výsledků vyplývá, že amplifikace *MDM2* měla pozitivní vliv na přežití jak u skupiny léčené chemoradioterapií, tak u celé kohorty pacientů. Navíc měla amplifikace *P53* pozitivní vliv na přežití ve skupině všech pacientů. Z toho vyplývá, že je do gliomageneze zapojen velmi komplexní proces zpětnovazebné smyčky P53-MDM2.

Napříč skupinami byl odhalen negativní vliv polyzomie oblasti 22q12.2 na PFS, což by mohlo být předmětem pro další analýzy. Negativní efekt ztráty 22q na progresi gliomu byly už dříve zdokumentovány^{262–264}, a polyzomie oblasti 22q12.2 byla identifikována jako maligní komponenta u gangliomu. Tato oblast obsahuje gen *EWSR1*, který je spojen s Ewingovým sarkomem, s neuroektodermálními i dalšími druhy nádorů^{265,266}.

Kodelece 1p/19q je znakem oligodendrogliomů s relativně dobrou prognózou. GBM jsou často charakterizovány navýšeným počtem chromozomů 1/19 i 19/20 a obě varianty jsou spojovány s lepšími outcomy^{267,268}. Bohužel tento efekt nebyl pozorován u naší kohorty, což může být pravděpodobně způsobeno protikladným efektem jiných genetických aberací s negativním efektem na prognózu jako je například amplifikace *EGFR1*²⁶⁹.

Studie založené na pyrosekvenování prokázaly, že rozsáhlá metylace *MGMT* je spojena s delším OS a PFS u pacientů s GBM *IDH* wild type, což naznačuje možný pozitivní efekt DNA alkylačních chemoterapeutik^{270,271}. Studie provedená Marchi *et al.* prokázala prodloužení OS a PFS ve spojitosti s *MGMT* metylací u pacientů, kterým byla provedena maximální možná resekce následovaná chemoradioterapií. Ačkoli jsme použili stejný protokol molekulární analýzy, nepozorovali jsme tento efekt u naší kohorty GBM pacientů s totální resekci následovanou chemoradioterapií v porovnání s dalšími vyšetřovanými skupinami²⁷². Status metylace *MGMT* neměl vliv na klinickou léčbu u GBM pacientů; Stuppův protokol je považován za zlatý standard bez ohledu na metylaci *MGMT*.

Napříč literaturou neexistují studie o GBM zahrnující cut off hodnoty pro markery zahrnuté v naší studii. Z tohoto důvodu byla značná část této práce založena na stanovení LCN a HCN hodnot pro každý marker, což by mohlo posloužit i v následujících studiích z této oblasti.

Naše výsledky potvrdily prognostickou hodnotu klinických faktorů jako jsou věk, Karnofského skóre, kouření a použité terapeutické modality. Jak naznačují současné experimentální studie, kouření může způsobit maligní změny skrze indukci stimulace nikotinem. Napříč literaturou byly však nalezeny velmi rozporuplné výsledky^{65,273,274}. Výsledky naší studie naznačují negativní vliv kouření spojený s kratším OS a PFS ve skupině všech pacientů. Kuřáci byli v této skupině převážně muži, což může vysvětlit vliv pohlaví na OS a PFS: muži vykazovali kratší přežití než ženy. Tento efekt by si však zasloužil bližší prozkoumání.

Tato studie byla zaměřena na četnější skupinu pacientů s GBM *IDH* wild type, kteří mají velmi špatnou prognózu. Potvrdili jsme, že *IDH* wild type glioblastomy jsou velmi heterogenní skupina a prokázali jsme vliv molekulárních aberací na přežití. Ačkoli je Stuppův protokol brán jako standard chemoradioterapeutického režimu a je doporučován pro všechny pacienty s GBM *IDH* wild type, optimální terapeutická strategie je doposud výzvou. Pro vývoj efektivní personalizované léčebné strategie pro pacienty s GBM je potřeba pochopit jak určité biomarkery predikují odpověď na léčbu a jaký mají vliv na outcome pacientů^{249,253,254,275}.

2.3.5. Závěr

Velké množství studií je zaměřeno na prognostické faktory u pacientů s *IDH* mutovaným glioblastomem, který je charakterizován lepší prognózou; *IDH* wild type varianta s vyšší četností a vyšší úmrtností zůstává opomíjena. Předmětem naší studie byli pacienti s *IDH* wild type glioblastomem léčeni za posledních 15 let a jejichž *IDH* status byl vyšetřen dle doporučení WHO z roku 2016^{41,87}. Léčebná strategie u této kohorty pacientů byla maximální radikální a bezpečná resekce následovaná v možných případech onkoterapií. *IDH* wild type gliomy byly tradičně považovány za homogenní a nepříznivý histologický podtyp s omezenou odpovědí na onkoterapii, kde je preferován nihilistický management léčby. Avšak klinický outcome pacientů s tímto typem difuzního gliomu je ve skutečnosti charakterizován obrovskou heterogenitou. Skupina *IDH* wild type glioblastomů s nejhůřší prognózou byla charakterizována absencí pozitivních prognostických faktorů a prudkým růstem nádoru. Pacienti spadající do této skupiny byli léčeni pouze radioterapií nebo byli pouze sledováni. Cílem naší studie bylo nalézt klinicky a biologicky relevantní prognostické faktory pro *IDH* wild type glioblastomy a odhalit biologické mechanismy vysvětlující jaký mají tyto faktory vliv na prognózu a identifikovat klinicky relevantní podskupiny. Znalost těchto faktorů a jejich dopadu na prognózu by mohla usnadnit rozhodování o tom, jak agresivní by měla být onkologická strategie pro daného pacienta a zda je mimo to případně vyžadována reoperace. Prezentované výsledky specifických molekulárních markerů ve vztahu k přežití v této kohortě představují první krok k personalizaci léčby pacientů s *IDH* wild type GBM.

2.3.6. Podíl autora dizertační práce na daném tématu

Uvedená studie je publikována v časopise *Current Oncology* pod názvem *The influence of gene aberrations on survival in resected IDH wildtype glioblastoma patients: a single-institution study* (viz Přílohy). Autorka se podílela na designu a koordinaci studie včetně provedení vyšetření vzorků pomocí sekvenování a FISH. Zpracovala výsledky a následně rukopis studie.

3. Souhrn

Od roku 2016 jsou mutace IDH1/2 klíčovým parametrem v určování diagnózy, prognózy a léčebného režimu u difúzních astrocytárních a oligodendroglálních nádorů. Současný postup stanovení těchto mutací vychází z imunohistochemického vyšetření pomocí protilátek na průkaz přítomnosti nejčastější varianty *IDH1* R132H čítající 90 %. Zbýlých 10 % připadá na raritní varianty, které jsou dle WHO vyšetřovány sekvenováním. Toto vyšetření se doporučuje v případě negativního výsledku IHC *IDH* R132H a za podmínky, že není pacient starší 55 let. Nad tuto věkovou hranici je frekvence mutací uváděna pouze okolo 1 % a finanční nákladovost metod k takto nízkému zachytu je neúměrně vysoká.

V první části byla retrospektivně vyšetřena skupina pacientů s gliomem (n = 275), kteří podstoupili chirurgické odstranění nádoru. Četnost varianty mutace *IDH1* R132H byla v naší studii 91 %. Míra shody metod sekvenování a IHC byla spočítána na 94 % (60/64). Kromě zmiňované varianty R132H byly vyšetřeny raritní varianty včetně R132C (zachyt 3 % v naší studii), R132S (1 %) a R132G a R132L (v naší práci nebyla detekována). Varianty *IDH2* jsou méně časté, přičemž R172K byla pozorována u 3 % pacientů s gliomem, R172M (1 %), R172W (v naší studii nebyla nalezena) a R172S (v naší studii nebyla nalezena). V této studii byla prokázána shoda s již dříve publikovanými výsledky četnosti a frekvence jednotlivých variant mutací IDH u gliomů. Získané výsledky potvrzují, že je vhodné doplnit standardní IHC vyšetření o sekvenování a tak zamezit riziku falešně negativních vzorků. Celkové náklady fast IDH kitu vychází až o polovinu levněji oproti NexteraXT a zároveň dochází ke značnému zkrácení doby zpracování vzorku. Čímž byl zpochybněn model publikovaný DeWitt z roku 2017⁸⁷, který je založen na nákladech za NGS čítajících 1800 USD (~ 1500 eur) za vzorek. Z důvodu značného snížení nákladů na NGS vyšetření doporučujeme analyzování i gliálních nádorů pacientů starších 55 let a postupně by mohla tato metoda zcela nahradit imunohistochemické vyšetření.

Druhá část byla zaměřena na supratentoriální GBM *IDH* wild type u dospělých pacientů (N = 132), kteří podstoupili resekci a onkoterapii v období mezi červnem 2006 a červnem 2015. Pacienti byli rozděleni do tří skupin na základě léčebného režimu: bez terapie, léčení radioterapií a léčení chemoradioterapií. Spolu s molekulárně cytogenetickými charakteristikami, byly získány i klinické informace pacientů a tato data byla statisticky zpracována. Ve skupině pacientů léčených radioterapií byly nalezeny výrazné prognosticky negativní faktory pro OS jakými jsou 1q HCN, *BCR* HCN a *RB1* HCN, co se týče negativních prognostických faktorů PFS se jedná o 1q HCN a 22q12.2 HCN. Ve skupině pacientů léčených chemoradioterapií bylo jako negativními klinickými faktory označeno mužské pohlaví, vysoké Karnofského skóre, vyšší věk, vyšší exprese Ki67 a status 22q12.2 HCN. Naopak genetické markery jako *CCND1* HCN, 19q13 HCN, *MDM2* HCN a *P53* HCN byly potvrzeny jako pozitivní markery jak OS, tak PFS. I přes malý soubor pacientů bez terapie se zdá, že mužské pohlaví, status kouření a *CCND1* HCN mají negativní vliv na prognózu. V případě celé kohorty pacientů byly označeny za negativní prognostické faktory mužské pohlaví, *RB1* HCN a 22q12.2 HCN. Naopak status *EGFR1* HCN, *P53* HCN, *CCND1* HCN a 19q13 HCN se jeví jako pozitivní prognostické faktory.

4. Summary

Since 2016, IDH1/2 mutations have been a key parameter for the diagnosis, prognosis and treatment regimen of diffuse astrocyte and oligodendroglial tumors. The current procedure for examination of these mutations is based on immunohistochemical analysis with an antibody to determine the presence of the most common variant of *IDH1* R132H, which is counting about 90 %. The remaining 10 % are rare variants, which are according to the WHO investigated by sequencing. This procedure is recommended in case of a negative result of IHC *IDH* R132H in patients younger than 55 years. Above this age limit, the frequency of mutations is reported to be only around 1 %, and the financial cost of methods for such low detection is disproportionately high.

In the first part, a group of patients with glioma (n = 275) who underwent surgical removal of the tumor was retrospectively examined. The frequency of the *IDH1* R132H mutation variant in our study was 91 %. The concordance rate of the sequencing and IHC method was 94 % (60/64). In addition to the mentioned variant R132H, rare variants were examined including R132C (in the studied population, it was 3 %), R132S (1 %) and R132G and R132L (were not detected in our work). *IDH2* variants are less common, with R172K being observed in 3 % of glioma patients, R172M (1 %), R172W (not found in our cohort) and R172S (not found in our cohort). Our data agree with the previously reported stratification and frequency of *IDH* mutations in gliomas. The obtained results confirm that it is appropriate to supplement the standard IHC examination with sequencing and thus avoid the risk of false negative samples. The total cost of the fast IDH kit is up to half cheaper than NexteraXT and furthermore the sample processing time is significantly reduced. This finding deconstructs the model published by DeWitt in 2017⁸⁷, which is based on an NGS cost of \$ 1,800 (~ € 1,500) per sample. Due to the significant reduction in the cost of NGS examination, we recommend this analysis of glioma tumors in patients older than 55 years, and finally this method could completely replace immunohistochemical examination.

The second part was focused on adult supratentorial IDH wt GBM patients who underwent resection and oncotherapy between June 2006 and June 2015 (n = 132). Patients were divided into three groups according to the treatment regime: with no therapy, treated by radiotherapy and treated with chemoradiotherapy. Along with molecular cytogenetic characteristics the clinical data were obtained and statistically analyzed. The group with only radiotherapy: Strong negative prognostic factors of OS such as 1q HCN, BCR HCN, and RB1 HCN were confirmed in this group and, furthermore 1q HCN and 22q12.2 HCN was found to be a significant negative prognostic factor of PFS. The group with chemoradiotherapy: Negative clinical factors in the chemoradio-therapy group were male gender, high Karnofsky score, older age, higher expression of Ki67, and 22q12.2 HCN status. On the other hand, genetic markers such as CCND1 HCN, 19q13 HCN, MDM2 HCN, and p53 HCN indicate a positive influence on both OS and PFS in the chemoradiotherapy group. The group with no therapy: Although the group of patients comprised only a small number of participants, male gender, smoking status, and CCND1 HCN were marked as negative prognostic factors in this group. All patient cohort: Male gender, RB1 HCN, and 22q12.2 were confirmed to be negative prognostic markers in the group of all patients. On the contrary, EGFR1 HCN, p53 HCN, CCND1 HCN, and 19q13 HCN were positive prognostic factors.

5. Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Celosvětová incidence nádorů CNS v přepočtu na 100 000 obyvatel. Převzato z originálu ³	8
Obrázek 2: Míra přežití a distribuce jednotlivých difuzních nádorů dle doporučení WHO 2007 a aktualizace těchto dat dle WHO 2016. Převzato z originálu ¹³	9
Obrázek 3: Schéma Stuppova protokolu založeného na konkomitantní chemoradioterapii ³³	12
Obrázek 4: Klinický postup léčby <i>IDH</i> mutovaných difuzních gliomů u dospělých. Upraveno dle ³⁷	14
Obrázek 5: Klinický postup léčby <i>IDH</i> wild type difuzních gliomů u dospělých. Upraveno dle ³⁷	14
Obrázek 6: Zjednodušený algoritmus klasifikace difuzních gliomů založených na histologii a genetických znacích. Převzato z originálu ¹²	17
Obrázek 7: Funkce <i>IDH</i> a jejich mutovaných variant v kontextu buněčných pochodů. Je znázorněna různá lokalizace jednotlivých <i>IDH</i> a komplexní efekt u mutované varianty <i>IDH1</i> vs. wild type, kde skrz metabolické změny dochází k rozvoji tumorigeneze. Převzato z ⁷⁶	22
Obrázek 8: Jednotlivé varianty mutací <i>IDH1</i> a <i>IDH2</i> spolu s jejich A) frekvencemi a B) mutace kodonu 132 u <i>IDH1</i> a kodonu 172 u <i>IDH2</i> . Převzato z ⁷⁸	23
Obrázek 9: Stratifikace kohorty pacientů založená na léčebné modalitě spolu s detaily u aplikované léčby.	43
Obrázek 10: Výsledky multivariátního Coxova modelu proporčních rizik pro OS u studovaných proměnných (vybrané klinické faktory a molekulární markery) ve skupinách dle terapie, vyjádřeno poměrem rizik (bod – bodový odhad, úsečka koresponduje s 95 % intervalem spolehlivost; v případě většího intervalu je použita šipka) pro každou hladinu uvedených faktorů. Referenční kategorie je označena jako “(ref.)”. Každý faktor byl analyzován v separátním modelu s adjustací na kategorie věku a Karnofského skóre. Signifikantní výsledky ($p < 0.05$) jsou vyznačeny červeně; tečkovaná linie označuje poměr rizik roven 1.	50
Obrázek 11: Výsledky multivariátního Coxova modelu proporčních rizik pro PFS u studovaných proměnných (vybrané klinické faktory a molekulární markery) ve skupinách dle terapie, vyjádřeno poměrem rizik (bod – bodový odhad, úsečka koresponduje s 95 % intervalem spolehlivost; v případě většího intervalu je použita šipka) pro každou hladinu uvedených faktorů. Referenční kategorie je označena jako “(ref.)”. Každý faktor byl analyzován v separátním modelu s adjustací na kategorie věku a Karnofského skóre. Signifikantní výsledky ($p < 0.05$) jsou vyznačeny červeně; tečkovaná linie označuje poměr rizik roven 1.	51
Tabulka 1: Projekty experimentální léčby GBM, shrnuto podle ³⁶	12
Tabulka 2: Klasifikace, grade a kód morfologie dle WHO 2016.	16
Tabulka 3: Nejčastější nalezené změny u jednotlivých subtypů difuzních astrocytárních a oligodendroglálních nádorů dle WHO 2016 klasifikace. Upraveno dle ²¹⁰	31
Tabulka 4: Primery použité pro amplifikaci <i>IDH1</i> R132 a <i>IDH2</i> R172 při použití metody Nextera XT. .	36
Tabulka 5: Histologické subtypy difuzních gliomů zahrnutých do studie jednoho centra provedenou mezi roky 2011 – 2017 a charakteristika jednotlivých podskupin.	36
Tabulka 6: Charakteristika pacientů a výsledky genotypizace získané metodami FastIDH method a Nextera XT Library Prep Kit.	37

Tabulka 7: Kontrola kvality fast IDH assaye, byla použita data ze tří nezávislých běhů. Jako negativní kontrola byla použita ultrazvukově fragmentovaná DNA vyizolovaná z krve s mediánem velikosti fragmentace <100 bp. Do sekvenační knihovny byla přidána kontrola bez templátu (no template) z důvodu sledování kontaminace podle záměny indexu (index hopping) a/nebo kontaminace z předchozího běhu. DNA izolovaná z tkáně gliálního nádoru se známým statusem mutace IDH1/2 byla použita jako pozitivní kontrola a wild type kontrola.....	38
Tabulka 8: Primery a próby použité k detekci promotorové metylace <i>MGMT</i> , <i>E-cadherin</i> a <i>Alu-M5</i> .	45
Tabulka 9: Demografická data pro kohortu pacientů a informace o prevalenci nižšího nebo vyššího počtu kopií studovaných markerů.....	46
Tabulka 10: Výsledky stratifikovaného Coxova proporčního modelu rizik pro OS resp. PFS pro vybrané klinické faktory a molekulární markery adjustované pro kategorie Karnofského skóre a věku. Pro každý model a kategorii je uveden odhad relativních rizik (bodový odhad i 95% interval spolehlivosti) a p hodnota. Sloupec N představuje počet pacientů v každé hladině faktoru u podskupin. Výsledky pro adjustované faktory nejsou uvedeny.	48

6. Seznam zkratek

2OG	2-oxoglutarát/ α -ketoglutarát
Ag	antigen, protilátka
Akt	Serine/Threonine-Specific Protein Kinase
ARMS-PCR	Amplification-Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATRX	Alpha-Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked
BCR	Breakpoint Cluster Region Protein
BRAF	Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf
BRCA1/2	BRCA1/2 DNA Repair Associated
CCND1	Cyclin D1
CDKN2A/2B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/2B
CIC	Homologue of Drosophila Capicua
CNS	centrální nervová soustava
CT	počítačová tomografie
d-2HG	d-2-hydroxyglutarát
DAXX	Death-Associated Protein 6
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
EGFRvIII	delece exonů 2–7 u EGFR
FDA	Federal Drug Administration
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
FLAIR	Fluid Attenuated Inversion Recovery
fMRI	funkční magnetická rezonance
FUBP1	Far-Upstream Binding Protein 1
GBM	glioblastom
H3K27M	mutace histonu H3, záměna lyzinu 27 za methionin
HIF1 α	hypoxií indukovaný faktor
HIF–OH	hydroxylovaný HIF
HSV	<i>herpes simplex virus</i>
CHT	chemoterapie
CHT+RT	chemoradioterapie
IDH 1/2	isocitrát dehydrogenáza 1/2
IL-2	interleukin-2
LOH	ztráta heterozygotnosti
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
KDM	histon lysin demethyláza
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase
MAF	Mutation Allele
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MDM2	Mouse Double Minute 2 Homolog
MGMT	O6-methylguanin-DNA-methyltransferáza

MHL1	MutL homolog 1
MPS	masivně paralelní sekvenování
MSH2	MutS homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin Kinase
NADP+	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NB	nádorové buňky
NF1/2	nerofibromatóza typu 1/2
NOTCH1	Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1
NRAS	NRAS Proto-Oncogene, GTPase
PCV	kombinace prokarbazinu, lomustinu a vinkristinu
PET	pozitronová emisní tomografie
PET-CT	pozitronová emisní tomografie s rentgenovou výpočetní tomografií
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGFRA	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PHD	prolyl hydroxylázová doména enzymu HIF
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue
p14	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
p16	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
p53	Tumor Protein P53
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PMS2	PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair Protein
PT	protinádorová terapeutika
RB1	Retinoblastoma 1
RELA	RELA protoonkogen, podjednotka NF-KB
RIS	Retinoic Acid Inducible Skin-Specific Gene Transcript
RT	radioterapie
RTK	tyrosin kinázový receptor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TCA	trikarboxylové kyseliny
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TET	Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenáza
TGF α	Transforming Growth Factor
TP53	Tumor Protein P53
TSC1/2	Tuberous Sclerosis Protein 1/2
VAF	frakce alelové varianty/variant allele fraction
VEGFR	receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru
VHL	Von Hippel Lindau
WHO	World Health Organization
WT	wild type
α KG	α -ketoglutarát

7. Seznam literatury

1. DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med* 2001; 344: 114–123.
2. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, et al. Epidemiology of Gliomas. *Cancer Treat Res* 2015; 163: 1–14.
3. Patel AP, Fisher JL, Nichols E, et al. Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 2019; 18: 376–393.
4. Kapoor M, Gupta V. Astrocytoma. In: *Tumors and Cancers: Central and Peripheral Nervous Systems*. CRC Press, pp. 1–16.
5. www.svod.cz.
6. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, et al. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice Neurology* 2006; 2: 494–503.
7. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science (80-)* 2008; 321: 1807–1812.
8. Jaeckle KA, Eyre HJ, Townsend JJ, et al. Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: A Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3310–3315.
9. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* 2007; 114: 97–109.
10. Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 2015; 372: 2481–2498.
11. Furnari FB, Cloughesy TF, Cavenee WK, et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nature Reviews Cancer* 2015; 15: 302–310.
12. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131: 803–820.
13. Jiang H, Cui Y, Wang J, et al. Impact of epidemiological characteristics of supratentorial gliomas in adults brought about by the 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system. *Oncotarget* 2017; 8: 20354–20361.
14. Posti JP, Bori M, Kauko T, et al. Presenting symptoms of glioma in adults. *Acta Neurol Scand* 2015; 131: 88–93.
15. Nayak L, Deangelis LM, Brandes AA, et al. The Neurologic Assessment in Neuro-Oncology (NANO) scale: A tool to assess neurologic function for integration into the Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) criteria. *Neuro Oncol* 2017; 19: 625–635.
16. Pope WB, Brandal G. Conventional and advanced magnetic resonance imaging in patients with high-grade glioma. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2018; 62: 239–253.

17. VERGER A, LANGEN K-J. PET Imaging in Glioblastoma: Use in Clinical Practice. In: *Glioblastoma*. Codon Publications, pp. 155–174.
18. Hamisch CA, Minartz J, Blau T, et al. Frame-based stereotactic biopsy of deep-seated and midline structures in 511 procedures: feasibility, risk profile, and diagnostic yield. *Acta Neurochir (Wien)* 2019; 161: 2065–2071.
19. Kageji T, Nagahiro S, Uyama S, et al. Histopathological findings in autopsied glioblastoma patients treated by mixed neutron beam BNCT. *J Neurooncol* 2004; 68: 25–32.
20. Grabowski MM, Recinos PF, Nowacki AS, et al. Residual tumor volume versus extent of resection: Predictors of survival after surgery for glioblastoma. *J Neurosurg* 2014; 121: 1115–1123.
21. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: Prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001; 95: 190–198.
22. Berger MS, Deliganis A V., Dobbins J, et al. The effect of extent of resection on recurrence in patients with low grade cerebral hemisphere gliomas. *Cancer* 1994; 74: 1784–1791.
23. Jenkinson MD, Barone DG, Bryant A, et al. Intraoperative imaging technology to maximise extent of resection for glioma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*; 2018. Epub ahead of print 22 January 2018. DOI: 10.1002/14651858.CD012788.pub2.
24. Duffau H. Awake surgery for incidental WHO grade II gliomas involving eloquent areas. *Acta Neurochir (Wien)* 2012; 154: 575–584.
25. Duffau H. Long-term outcomes after supratotal resection of diffuse low-grade gliomas: a consecutive series with 11-year follow-up. *Acta Neurochir (Wien)* 2016; 158: 51–58.
26. Yordanova YN, Moritz-Gasser S, Duffau H. Awake surgery for WHO grade II gliomas within ‘noneloquent’ areas in the left dominant hemisphere: Toward a ‘supratotal’ resection - Clinical article. *J Neurosurg* 2011; 115: 232–239.
27. Sanai N, Berger MS. Surgical oncology for gliomas: The state of the art. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2018; 15: 112–125.
28. Corso CD, Bindra RS, Mehta MP. The role of radiation in treating glioblastoma: here to stay. *Journal of Neuro-Oncology* 2017; 134: 479–485.
29. Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology* 1980; 30: 907–911.
30. Cabrera AR, Kirkpatrick JP, Fiveash JB, et al. Radiation therapy for glioblastoma: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Pract Radiat Oncol* 2016; 6: 217–225.
31. Karim ABMF, Afra D, Cornu P, et al. Randomized trial on the efficacy of radiotherapy for cerebral low-grade glioma in the adult: European Organization for Research and Treatment of Cancer Study 22845 with the Medical Research Council study BRO4: An interim analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 52: 316–324.
32. Fine HA, Dear KBG, Loeffler JS, et al. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 1993; 71: 2585–2597.

33. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987–996.
34. Darlix A, Mandonnet E, Freyschlag CF, et al. Chemotherapy and diffuse low-grade gliomas: a survey within the European Low-Grade Glioma Network. *Neuro-Oncology Pract* 2019; 6: 264–273.
35. Peyre M, Cartalat-Carel S, Meyronet D, et al. Prolonged response without prolonged chemotherapy: A lesson from PCV chemotherapy in low-grade gliomas. *Neuro Oncol* 2010; 12: 1078–1082.
36. Jain KK. A critical overview of targeted therapies for glioblastoma. *Frontiers in Oncology* 2018; 8: 419.
37. Weller M, van den Bent M, Preusser M, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 2020; 17: 30.
38. Zülch KJ. *Histological typing of tumours of the central nervous system*. Geneva, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/8100204> (1979, accessed 12 December 2020).
39. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology* 2007; 170: 1445–1453.
40. Hasselblatt M, Jaber M, Reuss D, et al. Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype: A dissolving diagnosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2018; 77: 422–425.
41. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 2016; 131: 803–820.
42. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: Implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol* 2010; 120: 707–718.
43. Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol* 2015; 129: 867–873.
44. Yekula A, Gupta M, Coley N, et al. Adult H3K27M-mutant diffuse midline glioma with gliomatosis cerebri growth pattern: Case report and review of the literature. *Int J Surg Case Rep* 2020; 68: 124–128.
45. Wesseling P, van den Bent M, Perry A. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica* 2015; 129: 809–827.
46. Tork CA, Atkinson C. *Oligodendroglioma*. StatPearls Publishing, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32644610> (2020, accessed 29 October 2020).
47. Burnet NG, Jefferies SJ, Benson RJ, et al. Years of life lost (YLL) from cancer is an important measure of population burden - And should be considered when allocating research funds. *Br J Cancer* 2005; 92: 241–245.
48. Miller CR, Dunham CP, Scheithauer BW, et al. Significance of necrosis in grading of oligodendroglial neoplasms: A clinicopathologic and genetic study of newly diagnosed high-

- grade gliomas. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5419–5426.
49. Anderson MD, Gilbert MR. Treatment recommendations for anaplastic oligodendrogliomas that are codeleted. *Oncol (United States)*; 27.
 50. Knight J, Jesus O De. Pilocytic Astrocytoma, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560614/> (2020, accessed 12 December 2020).
 51. Soffietti R, Rudà R, Reardon D. Rare glial tumors. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V., 2016, pp. 399–415.
 52. Korshunov A, Witt H, Hielscher T, et al. Molecular staging of intracranial ependymoma in children and adults. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3182–3190.
 53. Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, et al. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes: Second edition. *J Natl Cancer Inst - Monogr* 2008; 2008: 1–93.
 54. Rice T, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Neuro-oncology practice: Understanding inherited genetic risk of adult glioma - A review. *Neuro-Oncology Pract* 2015; 3: 1–16.
 55. Kyritsis AP, Bondy ML, Rao JS, et al. Inherited predisposition to glioma. *Neuro-Oncology* 2010; 12: 104–113.
 56. D’Angelo F, Ceccarelli M, Tala, et al. The molecular landscape of glioma in patients with Neurofibromatosis 1. *Nat Med* 2019; 25: 176–187.
 57. Robertson LB, Armstrong GN, Olver BD, et al. Survey of familial glioma and role of germline p16INK4A/p14 ARF and p53 mutation. *Fam Cancer* 2010; 9: 413–421.
 58. Wrensch M, Lee M, Miike R, et al. Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 581–593.
 59. Wang LE, Bondy ML, Shen H, et al. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of glioma. *Cancer Res* 2004; 64: 5560–5563.
 60. Pearce MS, Salotti JA, Little MP, et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: A retrospective cohort study. *Lancet* 2012; 380: 499–505.
 61. Linos E, Raine T, Alonso A, et al. Atopy and risk of brain tumors: A meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1544–1550.
 62. Amirian ES, Zhou R, Wrensch MR, et al. Approaching a scientific consensus on the association between allergies and glioma risk: A report from the glioma international case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016; 25: 282–290.
 63. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro-Oncology* 2014; 16: 896–913.
 64. Hou L, Jiang J, Liu B, et al. Smoking and adult glioma: a population-based case-control study in China. *Neuro Oncol* 2016; 18: 105–113.
 65. Braganza MZ, Rajaraman P, Park Y, et al. Cigarette smoking, alcohol intake, and risk of glioma in the NIH-AARP diet and health study. *Br J Cancer* 2014; 110: 242–248.

66. Li H xing, Peng X xiao, Zong Q, et al. Cigarette smoking and risk of adult glioma: A meta-analysis of 24 observational studies involving more than 2.3 million individuals. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 3511–3523.
67. Koh HJ, Lee SM, Son BG, et al. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J Biol Chem* 2004; 279: 39968–39974.
68. Lee SH, Jo SH, Lee SM, et al. Role of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-ICDH) on cellular defence against oxidative injury by γ -rays. *Int J Radiat Biol* 2004; 80: 635–642.
69. Leighton F, Poole B, Lazarow PB, et al. The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes. I. Fractionation of peroxisome proteins. *J Cell Biol* 1969; 41: 521–535.
70. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (80-)* 2008; 321: 1807–1812.
71. Lee SM, Koh HJ, Park DC, et al. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1185–1196.
72. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; 462: 739–744.
73. Chowdhury R, Yeoh KK, Tian YM, et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep* 2011; 12: 463–469.
74. Turcan S, Rohle D, Goenka A, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 2012; 483: 479–483.
75. Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science (80-)* 2009; 324: 261–265.
76. Liu S, Cadoux-Hudson T, Schofield CJ. Isocitrate dehydrogenase variants in cancer — Cellular consequences and therapeutic opportunities. *Current Opinion in Chemical Biology* 2020; 57: 122–134.
77. Lass U, Nümann A, von Eckardstein K, et al. Clonal analysis in recurrent astrocytic, oligoastrocytic and oligodendroglial tumors implicates IDH1- mutation as common tumor initiating event. *PLoS One*; 7. Epub ahead of print 23 July 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0041298.
78. Arita H, Narita Y, Yoshida A, et al. IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain Tumor Pathol* 2015; 32: 79–89.
79. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro-Oncology* 2016; 18: 16–26.
80. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 2012; 3: 709–722.
81. Sasaki H, Zlatescu MC, Betensky RA, et al. Histopathological-molecular genetic correlations in referral pathologist-diagnosed low-grade ‘oligodendroglioma’. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 58–63.
82. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 2009; 11: 341–347.

83. Gupta K, Salunke P. Molecular markers of glioma: An update on recent progress and perspectives. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2012; 138: 1971–1981.
84. Zou P, Xu H, Chen P, et al. IDH1/IDH2 Mutations Define the Prognosis and Molecular Profiles of Patients with Gliomas: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2013; 8: e68782.
85. H Y, DW P, G J, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*; 360. Epub ahead of print 2009. DOI: 10.1056/NEJMOA0808710.
86. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: Implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol* 2010; 120: 707–718.
87. Dewitt JC, Jordan JT, Frosch MP, et al. Cost-effectiveness of IDH testing in diffuse gliomas according to the 2016 WHO classification of tumors of the central nervous system recommendations. *Neuro Oncol* 2017; 19: 1640–1650.
88. Robinson C, Kleinschmidt-DeMasters BK. IDH1-mutation in diffuse gliomas in persons age 55 years and over. *J Neuropathol Exp Neurol* 2017; 76: 151–154.
89. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 997–1003.
90. Gerson SL. MGMT: Its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4: 296–307.
91. Patel M, Vogelbaum MA, Barnett GH, et al. Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: Current challenges and future directions. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2012; 21: 1247–1266.
92. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: Ready for personalized medicine? *Nature Reviews Neurology* 2010; 6: 39–51.
93. Wick W, Meisner C, Hentschel B, et al. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology* 2013; 81: 1515–1522.
94. Estival A, Sanz C, Ramirez JL, et al. Pyrosequencing versus methylation-specific PCR for assessment of MGMT methylation in tumor and blood samples of glioblastoma patients. *Sci Rep* 2019; 9: 11125.
95. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821–9826.
96. Zhang H, Berezov A, Wang Q, et al. ErbB receptors: From oncogenes to targeted cancer therapies. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 2051–2058.
97. Downward J, Parker P, Waterfield MD. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* 1984; 311: 483–485.
98. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, et al. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 2005; 1: 2005.0010.
99. Chakravarti A, Chakladar A, Delaney MA, et al. *The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Mediates Resistance to Sequential Administration of Radiation and Chemotherapy in Primary Human Glioblastoma Cells in a RAS-dependent Manner* 1. 2002.

100. Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int*; 5. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.4103/2152-7806.132138.
101. Wen PY, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. *N Engl J Med* 2008; 359: 492–507.
102. Hegi ME, Diserens AC, Bady P, et al. Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib - A phase II trial. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 1102–1112.
103. Reardon DA, Nabors LB, Mason WP, et al. Phase I/randomized phase II study of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, with or without protracted temozolomide in adults with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol* 2015; 17: 430–439.
104. Neyns B, Sadones J, Joosens E, et al. Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann Oncol* 2009; 20: 1596–1603.
105. Malkki H. Trial Watch: Glioblastoma vaccine therapy disappointment in Phase III trial. *Nature reviews. Neurology* 2016; 12: 190.
106. Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, et al. Epidermal growth factor receptor in glioma: Signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance1. *Neoplasia* 2010; 12: 675–684.
107. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, et al. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994; 145: 1175–1190.
108. Weller M, Berger H, Hartmann C, et al. Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: Predictive or prognostic biomarker? *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6933–6937.
109. Hu N, Richards R, Jensen R. Role of chromosomal 1p/19q co-deletion on the prognosis of oligodendrogliomas: A systematic review and meta-analysis. *Interdiscip Neurosurg Adv Tech Case Manag* 2016; 5: 58–63.
110. Gladson CL, Prayson RA, Liu WM. The pathobiology of glioma tumors. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2010; 5: 33–50.
111. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 2015; 372: 2481–2498.
112. Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, et al. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science (80-)* 2011; 333: 1453–1455.
113. Woehrer A, Sander P, Haberler C, et al. FISH-based detection of 1p 19q codeletion in oligodendroglial tumors: Procedures and protocols for neuropathological practice - A publication under the auspices of the Research Committee of the European Confederation of Neuropathological Societies (Euro-CNS). *Clin Neuropathol* 2011; 30: 47–55.
114. Liu T, Yuan X, Xu D. Cancer-specific telomerase reverse transcriptase (Tert) promoter mutations: Biological and clinical implications. *Genes*; 7. Epub ahead of print 18 July 2016. DOI: 10.3390/genes7070038.
115. Pekmezci M, Rice T, Molinaro AM, et al. Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: additional prognostic roles of ATRX and TERT. *Acta Neuropathol* 2017; 133: 1001–1016.
116. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- 2013; 110: 6021–6026.
117. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH , and TERT Promoter Mutations in Tumors . *N Engl J Med* 2015; 372: 2499–2508.
 118. Arita H, Yamasaki K, Matsushita Y, et al. A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta Neuropathol Commun* 2016; 4: 79.
 119. Nguyen HN, Lie A, Li T, et al. Human TERT promoter mutation enables survival advantage from MGMT promoter methylation in IDH1 wild-type primary glioblastoma treated by standard chemoradiotherapy. *Neuro Oncol* 2017; 19: 394–404.
 120. Heuling ES, Knab F, Radke J, et al. Prognostic relevance of tumor purity and interaction with MGMT methylation in glioblastoma. *Mol Cancer Res* 2017; 15: 532–540.
 121. Synhaeve NE, van den Bent MJ, French PJ, et al. Clinical evaluation of a dedicated next generation sequencing panel for routine glioma diagnostics. 2018; 6: 126.
 122. Picketts DJ, Higgs DR, Bachoo S, et al. ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: Mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1899–1907.
 123. Ramamoorthy M, Smith S. Loss of ATRX Suppresses Resolution of Telomere Cohesion to Control Recombination in ALT Cancer Cells. *Cancer Cell* 2015; 28: 357–369.
 124. Sadic D, Schmidt K, Groh S, et al. Atrx promotes heterochromatin formation at retrotransposons. *EMBO Rep* 2015; 16: 836–850.
 125. Noh KM, Maze I, Zhao D, et al. ATRX tolerates activity-dependent histone H3 methyl/phos switching to maintain repetitive element silencing in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 6820–6827.
 126. Conte D, Huh M, Goodall E, et al. Loss of Atrx Sensitizes Cells to DNA Damaging Agents through p53-Mediated Death Pathways. *PLoS One*; 7. Epub ahead of print 17 December 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0052167.
 127. Leung JWC, Ghosal G, Wang W, et al. Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked gene product ATRX is required for proper replication restart and cellular resistance to replication stress. *J Biol Chem* 2013; 288: 6342–6350.
 128. Koschmann C, Calinescu AA, Nunez FJ, et al. ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Sci Transl Med* 2016; 8: 328ra28.
 129. Wiestler B, Capper D, Holland-Letz T, et al. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol* 2013; 126: 443–451.
 130. Ikemura M, Shibahara J, Mukasa A, et al. Utility of ATRX immunohistochemistry in diagnosis of adult diffuse gliomas. *Histopathology* 2016; 69: 260–267.
 131. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 2009; 137: 413–431.
 132. McLendon R, Friedman A, Bigner D, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008; 455: 1061–1068.

133. Leroy B, Fournier JL, Ishioka C, et al. The TP53 website: An integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. *Nucleic Acids Res*; 41. Epub ahead of print 1 January 2013. DOI: 10.1093/nar/gks1033.
134. Lin T, Chao C, Saito S, et al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 165–171.
135. Zheng H, Ying H, Yan H, et al. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* 2008; 455: 1129–1133.
136. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012; 2: 401–404.
137. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*; 6. Epub ahead of print 2 April 2013. DOI: 10.1126/scisignal.2004088.
138. Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, et al. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *American Journal of Pathology* 2015; 185: 1820–1833.
139. Krex D, Mohr B, Appelt H, et al. Genetic Analysis of A Multifocal Glioblastoma Multiforme: A Suitable Tool to Gain New Aspects in Glioma Development. *Neurosurgery* 2003; 53: 1377–1384.
140. Djuzenova CS, Fiedler V, Memmel S, et al. Actin cytoskeleton organization, cell surface modification and invasion rate of 5 glioblastoma cell lines differing in PTEN and p53 status. *Exp Cell Res* 2015; 330: 346–357.
141. England B, Huang T, Karsy M. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumor Biology* 2013; 34: 2063–2074.
142. Park CM, Park MJ, Kwak HJ, et al. Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin. *Int J Oncol* 2006; 28: 119–125.
143. Zheng H, Ying H, Yan H, et al. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* 2008; 455: 1129–1133.
144. Wang Y, Yang J, Zheng H, et al. Expression of Mutant p53 Proteins Implicates a Lineage Relationship between Neural Stem Cells and Malignant Astrocytic Glioma in a Murine Model. *Cancer Cell* 2009; 15: 514–526.
145. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013; 155: 462.
146. Takami H, Yoshida A, Fukushima S, et al. Revisiting TP53 mutations and immunohistochemistry - A comparative study in 157 diffuse gliomas. In: *Brain Pathology*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 256–265.
147. Hainaut P, Pfeifer GP. Somatic TP53 mutations in the era of genome sequencing. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 6. Epub ahead of print 1 November 2016. DOI: 10.1101/cshperspect.a026179.
148. Xiong S, Van Pelt CS, Elizondo-Fraire AC, et al. Synergistic roles of Mdm2 and Mdm4 for p53 inhibition in central nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3226–

3231.

149. Ghimenti C, Fiano V, Chiadò-Piat L, et al. Deregulation of the p14ARF/Mdm2/p53 pathway and G1/S transition in two glioblastoma sets. *J Neurooncol* 2003; 61: 95–102.
150. Canon J, Osgood T, Olson SH, et al. The MDM2 inhibitor AMG 232 demonstrates robust antitumor efficacy and potentiates the activity of p53-inducing cytotoxic agents. *Mol Cancer Ther* 2015; 14: 649–658.
151. Verreault M, Schmitt C, Goldwirt L, et al. Preclinical efficacy of the MDM2 inhibitor RG7112 in MDM2-amplified and TP53 wild-type glioblastomas. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 1185–1196.
152. Kim M, Ma DJ, Calligaris D, et al. Efficacy of the MDM2 inhibitor SAR405838 in glioblastoma is limited by poor distribution across the blood–brain barrier. *Mol Cancer Ther* 2018; 17: 1893–1901.
153. Kato S, Ross JS, Gay L, et al. Analysis of MDM2 Amplification: Next-Generation Sequencing of Patients With Diverse Malignancies. *JCO Precis Oncol* 2018; 1–14.
154. Montgomery RM, Queiroz L de S, Rogerio F. EGFR, p53, IDH-1 and MDM2 immunohistochemical analysis in glioblastoma: therapeutic and prognostic correlation. *Arq Neuropsiquiatr* 2015; 73: 561–568.
155. Thway K, Wang J, Swansbury J, et al. Fluorescence in situ hybridization for MDM2 amplification as a routine ancillary diagnostic tool for suspected well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas: Experience at a tertiary center. *Sarcoma*; 2015. Epub ahead of print 25 February 2015. DOI: 10.1155/2015/812089.
156. Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science (80-)* 1997; 275: 1943–1947.
157. Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biology and Therapy* 2008; 7: 1321–1325.
158. Ming M, He YY. PTEN in DNA damage repair. *Cancer Letters* 2012; 319: 125–129.
159. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1246–1256.
160. Srividya MR, Thota B, Shailaja BC, et al. Homozygous 10q23/PTEN deletion and its impact on outcome in glioblastoma: A prospective translational study on a uniformly treated cohort of adult patients. *Neuropathology* 2011; 31: 376–383.
161. Chenn A, Walsh CA. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science (80-)* 2002; 297: 365–369.
162. Fraser MM, Zhu X, Kwon CH, et al. Pten loss causes hypertrophy and increased proliferation of astrocytes in vivo. *Cancer Res* 2004; 64: 7773–7779.
163. Tilot AK, Gaugler MK, Yu Q, et al. Germline disruption of Pten localization causes enhanced sex-dependent social motivation and increased glial production. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 3212–3227.
164. Chen Y, Huang WC, Séjourné J, et al. Pten mutations alter brain growth trajectory and allocation of cell types through elevated β -Catenin signaling. *J Neurosci* 2015; 35: 10252–

- 10267.
165. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2009; 4: 127–150.
 166. Kitange GJ, Templeton KL, Jenkins RB. Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. *Current Opinion in Oncology* 2003; 15: 197–203.
 167. Yang JM, Schiapparelli P, Nguyen HN, et al. Characterization of PTEN mutations in brain cancer reveals that pten mono-ubiquitination promotes protein stability and nuclear localization. *Oncogene* 2017; 36: 3673–3685.
 168. Korshunov A, Sycheva R, Gorelyshev S, et al. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in nonbrainstem glioblastomas of childhood. *Mod Pathol* 2005; 18: 1258–1263.
 169. Van den Boom J, Wolter M, Kuick R, et al. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 2003; 163: 1033–1043.
 170. Majuelos-Melguizo J, Rodríguez MI, López-Jiménez L, et al. PARP targeting counteracts gliomagenesis through induction of mitotic catastrophe and aggravation of deficiency in homologous recombination in PTEN-mutant glioma. *Oncotarget* 2015; 6: 4790–4803.
 171. Sweeney SM, Cerami E, Baras A, et al. AACR project genie: Powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discov* 2017; 7: 818–831.
 172. Lu VM, O'Connor KP, Shah AH, et al. The prognostic significance of CDKN2A homozygous deletion in IDH-mutant lower-grade glioma and glioblastoma: a systematic review of the contemporary literature. *Journal of Neuro-Oncology* 2020; 148: 221–229.
 173. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: A prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5743–5750.
 174. Liu W, Lv G, Li Y, et al. Downregulation of CDKN2A and suppression of cyclin D1 gene expressions in malignant gliomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 76.
 175. Zerrouqi A, Pyrzynska B, Febbraio M, et al. P14ARF inhibits human glioblastoma-induced angiogenesis by upregulating the expression of TIMP3. *J Clin Invest* 2012; 122: 1283–1295.
 176. Reis GF, Pekmezci M, Hansen HM, et al. CDKN2A Loss Is Associated with Shortened Overall Survival in Lower-Grade (World Health Organization Grades II-III) Astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015; 74: 442–452.
 177. Purkait S, Jha P, Sharma MC, et al. CDKN2A deletion in pediatric versus adult glioblastomas and predictive value of p16 immunohistochemistry. *Neuropathology* 2013; 33: 405–412.
 178. Aveyard JS, Knowles MA. Measurement of relative copy number of CDKN2A/ARF and CDKN2B in bladder cancer by real-time quantitative PCR and multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Mol Diagnostics* 2004; 6: 356–365.
 179. Cachia AR, Indsto JO, McLaren KM, et al. *CDKN2A Mutation and Deletion Status in Thin and Thick Primary Melanoma 1*. 2000.
 180. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science (80-)* 1989; 246: 603–608.

181. Knudsen KE, Alan Diehl J, Haiman CA, et al. Cyclin D1: Polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 2006; 25: 1620–1628.
182. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704–707.
183. Zhang D, Dai D, Zhou M, et al. Inhibition of Cyclin D1 Expression in Human Glioblastoma Cells is Associated with Increased Temozolomide Chemosensitivity. *Cell Physiol Biochem* 2018; 51: 2496–2508.
184. Wang J, Wang Q, Cui Y, et al. Knockdown of cyclin D1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and attenuates the invasive capacity of human glioblastoma cells. *J Neurooncol* 2012; 106: 473–484.
185. Cemeli T, Guasch-Vallés M, Nàger M, et al. Cytoplasmic cyclin D1 regulates glioblastoma dissemination. *J Pathol* 2019; 248: 501–513.
186. Naqvi AZ, Mahjabeen I, Ameen S, et al. Genetic and expression variations of cell cycle pathway genes in brain tumor patients. *Biosci Rep*; 40. Epub ahead of print 1 May 2020. DOI: 10.1042/BSR20190629.
187. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu XY, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012; 482: 226–231.
188. Gojo J, Pavelka Z, Zapletalova D, et al. Personalized Treatment of H3K27M-Mutant Pediatric Diffuse Gliomas Provides Improved Therapeutic Opportunities. *Front Oncol* 2020; 9: 1436.
189. Tauziède-Espariat A, Saffroy R, Pagès M, et al. Cerebellar high-grade gliomas do not present the same molecular alterations as supratentorial high-grade gliomas and may show histone H3 gene mutations. *Clin Neuropathol* 2018; 37: 209–216.
190. Picart T, Barritault M, Berthillier J, et al. Characteristics of cerebellar glioblastomas in adults. *J Neurooncol* 2018; 136: 555–563.
191. Schreck KC, Ranjan S, Skorupan N, et al. Incidence and clinicopathologic features of H3 K27M mutations in adults with radiographically-determined midline gliomas. *J Neurooncol*; 143. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1007/s11060-019-03134-x.
192. Mosaab A, El-Ayadi M, Khorshed EN, et al. Histone H3K27M Mutation Overrides Histological Grading in Pediatric Gliomas. *Sci Rep*; 10. Epub ahead of print 1 December 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-65272-x.
193. Huang T, Garcia R, Qi J, et al. Detection of histone H3 K27M mutation and post-translational modifications in pediatric diffuse midline glioma via tissue immunohistochemistry informs diagnosis and clinical outcomes. *Oncotarget* 2018; 9: 37112–37124.
194. Fan Q-W, Weiss WA. Targeting the RTK-PI3K-mTOR Axis in Malignant Glioma: Overcoming Resistance. In: *Current topics in microbiology and immunology*. Curr Top Microbiol Immunol, pp. 279–296.
195. Westhoff M-A, Karpel-Massler G, Brühl O, et al. A critical evaluation of PI3K inhibition in Glioblastoma and Neuroblastoma therapy. *Mol Cell Ther* 2014; 2: 32.
196. Ströbele S, Schneider M, Schneele L, et al. A Potential Role for the Inhibition of PI3K Signaling in Glioblastoma Therapy. *PLoS One* 2015; 10: e0131670.

197. Langhans J, Schneele L, Trenkler N, et al. The effects of PI3K-mediated signalling on glioblastoma cell behaviour. *Oncogenesis*; 6. Epub ahead of print 1 November 2017. DOI: 10.1038/s41389-017-0004-8.
198. Zhao H fu, Wang J, Shao W, et al. Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: Current preclinical and clinical development. *Molecular Cancer* 2017; 16: 1–16.
199. Lisi L, Ciotti GMP, Chiavari M, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 1 in glioblastoma-associated microglia/macrophages. *Oncol Rep* 2020; 43: 2083–2092.
200. Dahiya S, Emmett RJ, Haydon DH, et al. BRAF-V600E mutation in pediatric and adult glioblastoma. *Neuro-Oncology* 2014; 16: 318–319.
201. Dougherty MJ, Santi M, Brose MS, et al. Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro Oncol* 2010; 12: 621–630.
202. Schindler G, Capper D, Meyer J, et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2011; 121: 397–405.
203. Lassaletta A, Zapotocky M, Mistry M, et al. Therapeutic and prognostic implications of BRAF V600E in pediatric low-grade gliomas. *J Clin Oncol* 2017; 35: 2934–2941.
204. Jones DTW, Kocialkowski S, Liu L, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res* 2008; 68: 8673–8677.
205. Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, et al. A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* 1988; 53: 309–319.
206. Martinho O, Longatto-Filho A, Lambros MBK, et al. Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and its ligand PDGFA in gliomas. *Br J Cancer* 2009; 101: 973–982.
207. Alentorn A, Marie Y, Carpentier C, et al. Prevalence, clinico-pathological value, and co-occurrence of PDGFRA abnormalities in diffuse gliomas. *Neuro Oncol* 2012; 14: 1393–1403.
208. Diaz RJ, Ali S, Qadir MG, et al. The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology* 2017; 133: 455–467.
209. Phuphanich S, Wheeler CJ, Rudnick JD, et al. Phase i trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62: 125–135.
210. Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, et al. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nature Reviews Neurology* 2019; 15: 405–417.
211. Perry A. WHO's arrived in 2016! An updated weather forecast for integrated brain tumor diagnosis. *Brain Tumor Pathol* 2016; 33: 157–160.
212. Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2018; 44: 139–150.
213. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 932–41.

214. Chen J-R, Yao Y, Xu H-Z, et al. Isocitrate Dehydrogenase (IDH)1/2 Mutations as Prognostic Markers in Patients With Glioblastomas. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e2583.
215. Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, et al. IDH1/2 mutation is a prognostic marker for survival and predicts response to chemotherapy for grade II gliomas concomitantly treated with radiation therapy. *Int J Oncol* 2012; 41: 1325–36.
216. Balss J, Meyer J, Mueller W, et al. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 2008; 116: 597–602.
217. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, et al. *IDH1* mutations at residue p.R132 (IDH1^{R132}) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat* 2009; 30: 7–11.
218. Kang MR, Kim MS, Oh JE, et al. Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer* 2009; 125: 353–355.
219. Sanson M, Marie Y, Paris S, et al. Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4150–4154.
220. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360: 765–773.
221. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. *IDH1* and *IDH2* Mutations in Gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360: 765–773.
222. Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. 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 Neuropathol* 2009; 118: 469–474.
223. Watanabe T, Vital A, Nobusawa S, et al. Selective acquisition of IDH1 R132C mutations in astrocytomas associated with Li-Fraumeni syndrome. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 653–656.
224. Xu X, Zhao J, Xu Z, et al. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *J Biol Chem* 2004; 279: 33946–57.
225. Camelo-Piragua S, Jansen M, Ganguly A, et al. A Sensitive and Specific Diagnostic Panel to Distinguish Diffuse Astrocytoma From Astrocytosis: Chromosome 7 Gain With Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 and p53. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; 70: 110–115.
226. Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol* 2015; 129: 867–873.
227. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, et al. Targeted Inhibition of Mutant IDH2 in Leukemia Cells Induces Cellular Differentiation. *Science (80-)* 2013; 340: 622–626.
228. Schumacher T, Bunse L, Pusch S, et al. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature* 2014; 512: 324–327.
229. Chen L, Voronovich Z, Clark K, et al. Predicting the likelihood of an isocitrate dehydrogenase 1 or 2 mutation in diagnoses of infiltrative glioma. *Neuro Oncol* 2014; 16: 1478–1483.
230. Pinkham MB, Telford N, Whitfield GA, et al. FISHing Tips: What Every Clinician Should Know About 1p19q Analysis in Gliomas Using Fluorescence in situ Hybridisation. *Clin Oncol* 2015; 27: 445–453.

231. Fox EJ, Reid-Bayliss KS. Accuracy of Next Generation Sequencing Platforms. *J Next Gener Seq Appl*; 01. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.4172/2469-9853.1000106.
232. Lee SC. Diffuse gliomas for nonneuropathologists: The new integrated molecular diagnostics. In: *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. College of American Pathologists, pp. 804–814.
233. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol* 2017; 18: e315–e329.
234. Zacher A, Kaulich K, Stepanow S, et al. Molecular Diagnostics of Gliomas Using Next Generation Sequencing of a Glioma-Tailored Gene Panel. *Brain Pathol* 2017; 27: 146–159.
235. Na K, Kim HS, Shim HS, et al. Targeted next-generation sequencing panel (TruSight Tumor 170) in diffuse glioma: a single institutional experience of 135 cases. *J Neurooncol* 2019; 142: 445–454.
236. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2014; 23: 1985–1996.
237. Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev* 2012; 26: 756–784.
238. Hou L, Jiang J, Liu B, et al. Smoking and adult glioma: A population-based case-control study in China. *Neuro Oncol* 2016; 18: 105–113.
239. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 459–466.
240. Liang J, Lv X, Lu C, et al. Prognostic factors of patients with Gliomas- A n analysis on 335 patients with Glioblastoma and other forms of Gliomas. *BMC Cancer* 2020; 20: 35.
241. Taylor OG, Brzozowski JS, Skelding KA. Glioblastoma multiforme: An overview of emerging therapeutic targets. *Frontiers in Oncology* 2019; 9: 963.
242. Silantyev AS, Falzone L, Libra M, et al. Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells*; 8. Epub ahead of print 9 August 2019. DOI: 10.3390/cells8080863.
243. Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, et al. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nature Reviews Neurology* 2019; 15: 405–417.
244. Sanai N, Berger MS. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery* 2008; 62: 753–764.
245. Sanai N, Polley MY, McDermott MW, et al. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas: Clinical article. *J Neurosurg* 2011; 115: 3–8.
246. Ziu M, Kim BYS, Jiang W, et al. The role of radiation therapy in treatment of adults with newly diagnosed glioblastoma multiforme: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline update. *Journal of Neuro-Oncology* 2020; 150: 215–267.
247. Xu Y, Geng R, Yuan F, et al. Identification of differentially expressed key genes between glioblastoma and low-grade glioma by bioinformatics analysis. *PeerJ*; 2019. Epub ahead of

print 2019. DOI: 10.7717/peerj.6560.

248. Li L, Liu X, Ma X, et al. Identification of key candidate genes and pathways in glioblastoma by integrated bioinformatical analysis. *Exp Ther Med* 2019; 18: 3439–3449.
249. Galbraith K, Kumar A, Abdullah KG, et al. Molecular correlates of long survival in IDH-Wildtype glioblastoma cohorts. *J Neuropathol Exp Neurol* 2020; 79: 843–854.
250. Dmitrenko V V., Iershov A V., Stetsyuk PI, et al. Determination of molecular glioblastoma subclasses on the basis of analysis of gene expression. *Cytol Genet* 2014; 48: 383–391.
251. Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, et al. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One*; 4. Epub ahead of print 13 November 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0007752.
252. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006; 9: 157–173.
253. Liu YQ, Wu F, Li JJ, et al. Gene Expression Profiling Stratifies IDH-Wildtype Glioblastoma With Distinct Prognoses. *Front Oncol* 2019; 9: 1433.
254. Ma S, Rudra S, Campian JL, et al. Prognostic impact of CDKN2A/B deletion, TERT mutation, and EGFR amplification on histological and molecular IDH-wildtype glioblastoma. *Neuro-Oncology Adv*; 2. Epub ahead of print 1 January 2020. DOI: 10.1093/nojnl/vdaa126.
255. Christians A, Adel-Horowski A, Banan R, et al. The prognostic role of IDH mutations in homogeneously treated patients with anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Acta Neuropathol Commun* 2019; 7: 156.
256. Biau J, Chautard E, De Schlichting E, et al. Radiotherapy plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma: a ‘real-life’ report. *Radiat Oncol* 2017; 12: 197.
257. Incekara F, van der Voort SR, Dubbink HJ, et al. Topographical Mapping of 436 Newly Diagnosed IDH Wildtype Glioblastoma With vs. Without MGMT Promoter Methylation. *Front Oncol* 2020; 10: 596.
258. Amelot A, De Cremoux P, Quillien V, et al. IDH-mutation is a weak predictor of long-term survival in glioblastoma patients. *PLoS One*; 10. Epub ahead of print 9 July 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0130596.
259. Sheikh S, Radivoyevitch T, Barnholtz-Sloan JS, et al. Long-term trends in glioblastoma survival: Implications for historical control groups in clinical trials. *Neuro-Oncology Pract* 2020; 7: 158–163.
260. Stensjøen AL, Solheim O, Kvistad KA, et al. Growth dynamics of untreated glioblastomas in vivo. *Neuro Oncol* 2015; 17: 1402–1411.
261. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science (80-)* 1989; 246: 603–608.
262. Laigle-Donadey F, Crinière E, Benouaich A, et al. Loss of 22q chromosome is related to glioma progression and loss of 10q. *J Neurooncol* 2006; 76: 265–268.
263. Nakamura M, Ishida E, Shimada K, et al. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2005; 85: 165–175.

264. Oskam NT, Bijleveld EH, Hulsebos TJM. A region of common deletion in 22q13.3 In human glioma associated with astrocytoma progression. *Int J Cancer* 2000; 85: 336–339.
265. Fisher C. The diversity of soft tissue tumours with EWSR1 gene rearrangements: A review. *Histopathology* 2014; 64: 134–150.
266. Pandita A, Balasubramaniam A, Perrin R, et al. Malignant and benign ganglioglioma: A pathological and molecular study¹. *Neuro Oncol* 2007; 9: 124–134.
267. Cimino PJ, McFerrin L, Wirsching H-G, et al. Copy number profiling across glioblastoma populations has implications for clinical trial design. *Neuro Oncol* 2018; 20: 1368–1373.
268. Geisenberger C, Mock A, Warta R, et al. Molecular profiling of long-term survivors identifies a subgroup of glioblastoma characterized by chromosome 19/20 co-gain. *Acta Neuropathol* 2015; 130: 419–434.
269. Mirchia K, Richardson TE. Beyond IDH-mutation: Emerging molecular diagnostic and prognostic features in adult diffuse gliomas. *Cancers* 2020; 12: 1–22.
270. Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S, et al. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: Refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol* 2019; 21: 167–178.
271. Radke J, Koch A, Pritsch F, et al. Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients. *Acta Neuropathol Commun* 2019; 7: 89.
272. Marchi F, Sahnane N, Cerutti R, et al. The Impact of Surgery in IDH 1 Wild Type Glioblastoma in Relation With the MGMT Deregulation. *Front Oncol* 2020; 9: 1569.
273. Hou L, Jiang J, Liu B, et al. Smoking and adult glioma: A population-based case-control study in China. *Neuro Oncol* 2016; 18: 105–113.
274. Li H xing, Peng X xiao, Zong Q, et al. Cigarette smoking and risk of adult glioma: A meta-analysis of 24 observational studies involving more than 2.3 million individuals. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 3511–3523.
275. Gittleman H, Cioffi G, Chunduru P, et al. An independently validated nomogram for isocitrate dehydrogenase-wild-type glioblastoma patient survival. *Neuro-Oncology Adv*; 1. Epub ahead of print 1 May 2019. DOI: 10.1093/oaajnl/vdz007.

8. Seznam publikací autora

8.1. Původní a přehledové práce

1. Sporikova Z, Koudelakova V, Trojanec R, Hajduch M. Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2018 Oct;18(5):e841-e850. doi: 10.1016/j.clbc.2018.07.023. Epub 2018 Aug 4. PMID: 30146351.
2. Sporikova Z., Koudelakova V., Hajduch M.: Prognostické a prediktivní faktory u pacientů s karcinomem prsu. *Onkologická revue* 01/2019.
3. Kalita O., Hrabalek L., Halaj M., Hok P., Franc D., Klementova Y., Dolezel M., Cechakova E., Sporikova Z., Drabek J., Hajduch M., Tuckova L.: Very late complications of oncotherapy in glioblastoma patients: A case series. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2021 Feb 22. doi: 10.5507/bp.2021.012. Epub ahead of print. PMID: 33612837.
4. Kalita O., Sporikova Z., Hajduch M, Megova Houdova M, Slavkovsky R, Hrabalek L, Halaj M, Klementova Y, Dolezel M, Drabek J, Tuckova L, Ehrmann J Jr, Vrbkova J, Trojanec R, Vaverka M. The Influence of Gene Aberrations on Survival in Resected *IDH* Wildtype Glioblastoma Patients: A Single-Institution Study. *Curr Oncol*. 2021 Mar 21;28(2):1280-1293. doi: 10.3390/curroncol28020122. PMID: 33801093; PMCID: PMC8025822.
5. Sporikova Z., Slavkovsky R., Tuckova L., Kalita O., Megova Houdova M., Ehrmann J., Hajduch M., Hrabalek L., Vaverka M.: *IDH1/2* mutations in Czech patients with diffuse gliomas: a single centre retrospective massively parallel sequencing analysis. Accepted 26/10/2021 in *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*.

8.2. Prvoautorské přednášky a postery přednesené na odborných fórech

1. Crlikova Z., Megova M., Vrbkova J., Trojanec R., Tuckova L., Potockova J., Hajdúch M: GeneticChanges In RecurrentGlioblastoma. Prague Onco „7. pražské mezioborové onkologické kolokvium“, January 27th-29th, Prague, Czech Republic
2. Crlikova Z., Megova M., Vrbkova J., Trojanec, Tuckova L., Potockova J., Hajdúch M: Genetic changes in recurrent Glioblastoma – Is there any significance? X. Days of diagnostic, predictive and experimental oncology, November 2nd-3rd, 2014, Olomouc, Czech Republic.
3. Crliková Z., Trojanec R.: Recurrent Glioblastoma. 2015 Évy Tudományos Diakköri Konferenciája. Február 10-14, Szeged.
4. Crliková Z., Megova M., Štaffová K., Rabčanová M.,Vrbková J., Drábek J., Trojanec, Tuckova L., Potockova J., Hajdúch M:OncoScananalysis in recurrentglioblastoma. TheJournalofThe Czech and SlovakOncologicalSocieties, XXXIX. Brněnské onkologické dny a XXIX konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky, 8.-10.4.2015, Brno.
5. Crliková Z., Megová M., Vrbková J., Trojanec R., Tučková L., Potockova J., Mlčochová S., Hajdúch M:RecurrentGlioblastoma.The Journalof The Czech and Slovak Oncological Societies, XXXIX.

Brněnské onkologické dny a XXIX konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky, 8.-10.4.2015, Brno.

6. Šporiková Z., Megová M., Štaffová K., Srovnal J., Rabčanová M., Vrbková J., Drábek J., Trojanec R., Tučková L., Hajdúch M.: Oncoscan analysis in paired samples of primary and recurrent glioblastoma. XI. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, December 2nd-3rd, 2015, Olomouc, Czech Republic.
7. Šporiková Z., Megová M., Štaffová K., Srovnal J., Rabčanová M., Vrbková J., Drábek J., Trojanec R., Tučková L., Hajdúch M.: Komparativní genomová analýza primárního a rekurentního glioblastomu. Prague Onco „7. pražské mezioborové onkologické kolokvium“, January 27th-29th, Prague, Czech Republic
8. Šporiková Z., Megová M., Štaffová K., Srovnal J., Rabčanová M., Vrbková J., Potočková J., Trojanec R., Tučková L., Hajdúch M.: Prognostické a prediktivní markery u glioblastomu multiforme. The Journal of The Czech and Slovak Oncological Societies, XL. Brněnské onkologické dny a XXX konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky, 27.-29.4.2016, Brno.
9. Šporiková Z., Megová M., Štaffová K., Srovnal J., Rabčanová M., Potočková J., Vrbková J., Drábek J., Trojanec R., Tučková L., Hajdúch M.: Genomická analýza rekurentního glioblastomu (genomic analysis of recurrent glioblastoma). The 12th Symposium and Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry. 2.-3.6.2016 Olomouc.
10. Šporiková Z., Kalita O., Hajdúch M., Trojanec R., Megová-Houdová M., Vaverka M., Hrabálek L., Zlevorová M., Vrána D., Drábek J., Tučková L., Ehrmann J., Vrbková J.: Gene aberrations in IDH-wild type glioblastoma. XIV. Days of diagnostic, predictive and experimental oncology, November 28th-30th, 2017, Olomouc, Czech Republic.
11. Šporiková Z., Kalita O., Hajdúch M., Trojanec R., Megová Houdová M., Vaverka M., Hrabálek L., Zlevorová M., Vrána D., Drábek J., Tučková L., Ehrmann J. jr., Vrbková J. Genové aberace u glioblastomu multiforme IDH wild type Prague Onco „10. pražské mezioborové onkologické kolokvium“, January 24th-26th, Prague, Czech Republic.
12. Šporiková Z., Megová M., Štaffová K., Srovnal J., Rabčanová M., Vrbková J., Drábek J., Trojanec R., Tučková L., Hajdúch M.: Genové aberace u glioblastomu multiforme IDH-wild type. XLII. Brněnské onkologické dny. 16.-18.5.2018, Brno, Czech Republic.
13. Šporiková Z., Kalita O., Hajdúch M., Trojanec R., Megová Houdová M., Vaverka M., Hrabálek L., Zlevorová M., Vrána D., Drábek J., Tučková L., Ehrmann J. jr., Vrbková J. Prognosticko prediktivní markery u IDH wild type glioblastomu. Molecular Pathology Days. 14.-15.6.2018 Olomouc
14. Šporiková Z.: Mapping of molecular landscape underlying drug resistance and recurrence in glioblastoma paired primary and recurrent tumours and glioblastoma resistant cell lines. Reactor, Pastviny 18th-21st September 2018.
15. Z. Šporiková , M. Megová Houdová , R. Trojanec , O. Kalita , J. Vrbková , J. Drábek , V. Koudeláková, M. Hajdúch: Drug resistance and recurrence in glioblastoma: molecular cytogenetic

analysis in paired primary and recurrent form. 13th meeting of European Association of Neuro-oncology, Stockholm October 10-14, 2018.

16. Šporiková Z., Kalita O., Hajdúch M., Trojanec R., Megová Houdová M., Vaverka M., Hrabálek L., Zlevorová M., Vrána D., Drábek J., Tučková L., Ehrmann J. jr., Vrbková J. IDH1/2 in diffuse gliomas: retrospective mutation analysis. XIV. Days of diagnostic, predictive and experimental oncology, November 19th-21st, 2018, Olomouc, Czech Republic.

17. Z. Šporiková, M. Megová Houdová, R. Trojanec, J. Srovnal, V. Balík, J. Ehrmann, M. Hajdúch: Molekulárně cytogenetické aberace u meningeomů. Prague Onco „11. pražské mezioborové onkologické kolokvium“, January 23th-25th, Prague, Czech Republic.

18. Z. Šporiková, M. Megová Houdová, R. Trojanec, J. Srovnal, V. Balík, J. Ehrmann, M. Hajdúch: Molekulární a cytogenetické znaky meningeomů. XLIII. Brněnské onkologické dny. 10.-12.4.2019, Brno, Czech Republic.

mutations have become critical diagnostic tools that are used to guide clinical decision making relating to gliomas.²

The incidence of *IDH1* mutations in glioblastomas is ~12%⁴ but studies on grade II to III gliomas and secondary glioblastomas found these mutations in ~80% of samples.^{9,13} *IDH2* mutations are less common and are mutually exclusive with *IDH1* mutations.^{13,14} All *IDH1* and *IDH2* mutations observed in glioblastomas are single amino acid missense mutations at arginine 132 (R132) or the analogous arginine 172 (R172), respectively. The most frequent variant, *IDH1* R132H, is found in over 85% of gliomas¹⁵ and features a heterozygous missense mutation of arginine to histidine (CGT→CAT). This mutation changes the enzyme's active site, reducing its catalytic activity and its affinity for isocitrate.¹⁶

The detection of R132 and R172 variants has implications for glioma diagnosis,¹⁷ prognosis^{14,18} and potentially treatment.^{19,20} However, the only variant that can be detected by immunohistochemistry (IHC) is *IDH1* R132H; the other variants are currently detected by follow-up genetic sequencing using Sanger or next-generation technology.² On the basis of studies examining the effects of variables such as patient age, tumor grade, and *IDH1* R132H IHC, the WHO recommended in 2016 that only glioma patients below 55 years of age should undergo sequencing for rare *IDH1* mutations following a negative *IDH1* R132H IHC analysis.^{2,21,22} Screening for *IDH* mutations has thus become a key diagnostic tool for brain tumors but is not cost-effective for all patients.²²

Since the *IDH* mutations status is crucial for diagnostic algorithm for integrated classification of diffuse astrocytic and oligodendroglial tumors, the revelations true positive/negative samples is a necessity these days. Our aim was to reveal samples by massively parallel sequencing (MPS) approaches that were signed as false negative samples by the IHC methodology and if there is a space for reduction of expenses and/or increasing the efficiency of genotyping when using different approaches of next-generation sequencing (NGS) methodology. Our fast *IDH* method is suitable for genotyping of known hotspots for somatic mutations with concordant results validated by the commercially available kit (Nextera XT kit, Illumina).

MATERIAL AND METHODS

Study Group and Tissue Specimens

The study cohort consisted of 275 patients with gliomas who had undergone surgical intervention at the Department of Neurosurgery in Olomouc between the years 2011 and 2017. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sample was collected from each participating patient, and all samples included in the study were validated by a pathologist experienced with CNS tumors.

IHC

The 1 to 2 µm thick tissue sections were pretreated using the system PT Link (Agilent) at 97°C, pH9 for 20 minutes to ensure epitope retrieval. Hydrogen peroxide was used to block endogenous peroxidase activity. The sections were subsequently treated with primary antibody, Anti-*IDH1* R132H, clone H09 (Dianova, Hamburg, Germany),

dilution 1 : 100 for 20 minutes at room temperature. EnVision Flex+, Mouse, High pH (Agilent DAKO) was used to amplify the signal of primary antibody. After the application of the secondary antibody EnVision, Flex/HRP (Agilent DAKO) for 20 minutes, the reaction was finally visualized using DAB+ Substrate Chromogen System (Agilent DAKO).

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

The 1p/19q gene co-deletion was detected by FISH, which was performed in accordance with the manufacturer's protocol for FFPE tissue sections (IntelMed Ltd., Olomouc, Czech Republic). The locus-specific identifiers 1p36.3 and 19q13 were used for chromosome copy number enumeration. At least 100 nonoverlapping nuclei were selected for assessment in each sample using fluorescence microscopy.

IDH1 and *IDH2* Genotyping by Next-Generation Sequencing

The protocols used for DNA extraction from FFPE tissue sections and *IDH1* R132 and *IDH2* R172 genotyping are provided in the supplementary material and methods (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/AJMM/A328>). Two NGS-based methods were used to increase the reliability of the results. Also, the genotyping was repeated in case of discordant results by 2 methods. Briefly, the first commercial method included amplification of specific regions and preparation of library using tagmentation (Nextera XT kit, Illumina). The second Fast method included multiplex amplification comprising *IDH1* and *IDH2* reactions with specific primers containing overhangs required for sequencing and this process is followed by amplicon purification. These primers ensures skipping the process of tagmentation and indexing resulting in substantial time-saving.

RESULTS

IHC

A total of 275 patient (mean age = 60.2 y) samples were histologically evaluated by the pathologist according to the 2016 CNS WHO recommendations by the pathologist, therefrom 11 samples were unable to be IHC examined for *IDH1* R132H (Table 1).² The samples were then subdivided according to IHC R132H positivity (mutated) or negativity (WT). The data were stratified by tumor subtype; R132H immunoreactivity was observed in 60 of 275 samples (22%).

FISH

No generally accepted cut-off values suitable for analytical validation of 1p or 19q deletions detection in oligodendroglioma have been reported²³ therefore we set the cut-off at 20% of nuclei harboring only 1 copy. FISH analysis indicated the presence of the 1p/19q co-deletion in 6 of 8 IHC R132H positive samples, one sample could not be repeatedly analyzed probably because of tissue processing error.

TABLE 1. Histologic Subtypes of Diffuse Gliomas Included in Our Single Center Study Conducted Between 2011 and 2017, Showing Subgroup Characteristics

Diagnosis	Grade	N/Total (%)	MF	Age Mean/Range (y)
IHC-IDH R132H WT				
Oligodendroglioma	II	1/10 (10%)	0/1	9.3
1p/19q co-deleted		0	0	—
Anaplastic oligodendroglioma	III	4/12 (33.3%)	2/2	54.1 (30.3–54.1)
Diffuse astrocytoma	II	17/40 (42.5%)	10/7	43.0 (22.8–76.1)
Anaplastic astrocytoma	III	22/35 (62.9%)	9/13	64.6 (33.2–81.6)
Glioblastoma	IV	162/178 (91.0%)	104/58	61.8 (23.7–84.3)
IHC-IDH R132H mutated				
Oligodendroglioma	II	9/10 (90%)	6/3	49.3 (33.1–73.0)
1p/19q co-deleted		6/8 (75%)	4/2	51.7 (34.3–73.0)
Anaplastic oligodendroglioma	III	8/12 (66.7%)	3/5	49.6 (33.1–68.7)
Diffuse astrocytoma	II	22/40 (55%)	10/12	42.3 (23.1–70.8)
Anaplastic astrocytoma	III	9/35 (25.7%)	5/4	40.0 (27.6–56.7)
Glioblastoma	IV	12/178 (6.7%)	7/5	47.9 (33.8–75.2)

F indicates female; M, male; WT, wild type.

Sequencing of IHC IDH1 WT Patients Below 55 Years of Age

To maximize cost-effectiveness rising from low prevalence of *IDH* mutations in patients 55 years or above,²² only tumors from patients under the age of 55 with WT *IDH1* according to IHC (n=63) were sequenced (Table 2).

The sequencing results indicated that 10 of the 63 samples (16%) were either *IDH1* R132 or *IDH2* R172 mutated. The 2 sequencing methods gave consistent results for all 10 positive samples; 2 samples could not be successfully analyzed by at least 1 of the methods (Table 3). As expected, we detected rare mutations in *IDH1* (R132S and R132C) were present in 3 samples). In addition, 3 samples were found to carry rare *IDH2* mutations in codon 172 that were not detectable by IHC. Surprisingly, 4 samples were genotyped as being *IDH1* R132H positive even though the IHC data indicated that all samples chosen for sequencing contained only WT *IDH*. Two samples could not be analyzed because of low input DNA quality and poor PCR amplification of targeted regions. Furthermore 1 sample of 11 that could not be IHC analyzed and fulfilled the age criteria was unequivocally signed as *IDH* R132H mutated (Table 3, case No. 8).

Quality Control of Sequencing Assay

The typical NGS assays consist of > 30 PCR cycles that include more than billion-fold amplification of targeted DNA segments followed by manipulation of amplicons, leading to concern for amplicon contamination and repeatability of results. In Table 4 we present the results analysis of different types of controls for fast *IDH*. To increase the contamination possibility, we ranked samples for processing using regular alternation pattern (wt or negative alternating with *IDH1* R132H mutation positive) as shown in Table 4. For negative control we used heavily fragmented (< 100 bp) low amount of DNA (~1 ng/μL) isolated from blood of donor, or no template controls where no template was added, however, base calling and data processing were handled as usual. We did not observed any contamination as wt samples contained 0.17% of variant c.395G > A (n=6), which is expected overall error rate caused by library preparation followed by Illumina based sequencing.²⁴ For no template/fragmented DNA we observed on average less than one c.395G > A variant bearing read and 3 c.395G > A reads were observed at maximum (n= 12). This would translate in <0.3% contamination when assuming 1000 or more reads are required for the processing. Also we observed high repeatability and reproducibility of c.395G > A containing sample. VAF was equal to 32.1% ± 0.6% (n=8, average ± SD).

TABLE 2. Characteristics of Patients Aged 55 Years or Below Selected for Sequencing to Detect *IDH* Mutations in Codons 132 and 172

Diagnosis	Grade	MF	Age Mean/Range (y)	Mutated <i>IDH</i> Codons R132 and 172 /Total
Oligodendroglioma	II	0/1	9	0/1 (0%)
1p/19q co-deleted		0	—	0
Anaplastic oligodendroglioma	III	1/2	46 (30–54)	2/3 (67%)
Diffuse astrocytoma	II	5/5	35 (23–53)	6/10 (60%)
Anaplastic astrocytoma	III	4/2	43 (33–54)	2/6 (33%)
Glioblastoma	IV	26/17	48 (24–55)	2/43 (5%)

F indicates female; IDH, M, male.

TABLE 3. Patient Characteristics and Genotyping Results Obtained Using the FastIDH Method and the Nextera XT Library Prep Kit

Case No.	Age (y)	Sex	Side	Location	Subtype	WHO Grade	IDH Nextera Variant	MAF, %	IDH Fast Variant	MAF, %
1	53	F	Right	Frontal	Anaplastic oligodendroglioma	III	IDH2 R172K	56	IDH2 R172K	48
2	30	M	Left	Frontal	Diffuse (fibrillar) astrocytoma	II	IDH2 R172M	59	IDH2 R172M	46
3	32	M	Left	Frontal	Diffuse (fibrillar) astrocytoma	II	IDH1 R132C	14	IDH1 R132C	13
4	33	F	Left	Frontal	Anaplastic astrocytoma	III	IDH1 R132C	64	IDH1 R132C	48
5	33	F	Left	Frontal	Diffuse (fibrillar) astrocytoma	II	IDH1 R132S	35	IDH1 R132S	34
6	33	F	Left	Frontal	Diffuse (fibrillar) astrocytoma	II	IDH1 R132H	23	IDH1 R132H	29
7	35	M	Right	Temporal	Diffuse astrocytoma	II	IDH1 R132H	15	IDH1 R132H	35
8	38	M	Left	Temporal	Diffuse (gemistocytic) astrocytoma	II	IDH1 R132H	26	IDH1 R132H	28
9	54	M	Left	Temporal	Anaplastic oligoastrocytoma	III	IDH2 R172K	50	IDH2 R172K	38
10	47	F	Right	Frontal	Diffuse astrocytoma	II	IDH1 R132H	15	IDH1 R132H	15
11	45	M	Right	Frontal	Glioblastoma	IV	Not analyzable		Not analyzable	
12	53	M	Right	Temporal	Glioblastoma	IV	wt		Not analyzable	

Nucleotide substitutions in our samples for IDH mutations: IDH1 R132H-c.395G>A; IDH1 R132C-c.394C>T; IDH1 R132S-c.394C>A; IDH2 R172M-c.515G>T; IDH2 R172K-c.515G>A.

F indicates female; IDH, isocitrate dehydrogenase 1; M, male; MAF, mutation allelic fraction in the sample; wt, wild type.

TABLE 4. Quality Control for FastIDH Assay

Run ID	Index	Sample	Result (If Available)	c.395A Count (R132H)	Total Read Count	VAF c.395G>A (R132H)
FR124	130	Neg. contr. fr. DNA		0	0	NA
FR124	131	Positive control 1	IDH1 R132H	1990	6078	32.7%
FR124	132	Neg. contr. fr. DNA		1	7	NA
FR124	133	Positive control 1	IDH1 R132H	1695	5294	32.0%
FR124	135	Neg. contr. fr. DNA		0	0	NA
FR124	136	Positive control 1	IDH1 R132H	1853	5663	32.7%
FR124	138	Wt control 1	wt	5	4258	0.1%
FR124	141	Neg. contr. fr. DNA		3	4	NA
FR124	142	Positive control 1	wt	2352	7490	31.4%
FR122	130	Wt control 2	wt	7	3569	0.2%
FR122	132	Positive control 1	IDH1 R132H	1290	3994	32.3%
FR122	136	Wt control 2	wt	3	1268	0.2%
FR122	138	Positive control 1	IDH1 R132H	1539	4829	31.9%
FR122	136	Wt control 2	wt	7	4761	0.1%
FR122	142	Positive control 1	IDH1 R132H	1651	5077	32.5%
FR122	131	Neg. contr. no template		0	15	NA
FR122	133	Neg. contr. no template		0	0	NA
FR122	135	Neg. contr. no template		0	0	NA
FR120	130	Neg. contr. no template		1	5	NA
FR120	131	Neg. contr. no template		0	7	NA
FR120	132	Neg. contr. no template		0	0	NA
FR120	133	Neg. contr. no template		0	1	NA
FR120	135	Neg. contr. no template		0	0	NA
FR120	136	Positive control 2	IDH1 R132H	5744	14602	39%
FR120	138	Positive control 1	IDH1 R132H	4702	15031	31%
FR120	141	Wt control 3	wt	26	17907	0.1%
FR120	142	Wt control 4	wt	18	15300	0.1%
				Average c.395A count	Aver. total read count	VAF average ±SD
		IDH1 R132H positive control 1 (n=8)		2134	6131	32.1%±0.6%
		Wt controls (n=6)		8	12259	0.17%±0.04%
		Negative control: no template/fr. DNA (n=12)		0.2	3.1	NA

Data from 3 independent runs were used.

For negative control with fragmented DNA we used ultrasound fragmented donor blood DNA with median fragment size <100 bp.

For no template control on DNA library was added to the sequencer in order to see the contamination based on index hopping and/or sequencer overflow.

DNA isolated from gliad tumor tissue with known IDH1/2 status was used as positive control and wt control.

IDH indicates isocitrate dehydrogenase 1; NA, not analyzable; VAF, variant allelic fraction; wt, wild type.

DISCUSSION

The integration of phenotypic and genotypic parameters in the classification of CNS tumors has improved diagnosis. The frequency of the *IDH1* R132H variant is reported to be ~90% (it was 91% in our studied population), and this mutant can be detected by IHC.²⁵ IHC detection of the *IDH1* R132H variant was performed using the DIA-H09 antibody, for which the expected true positive rate is 88% to 99%. If we assume that all samples found to be *IDH1* R132H positive by IHC would also be *IDH1* R132H positive by sequencing, the concordance rate of the sequencing and IHC methods would be 94% (60/64). A number of other *IDH1* variants are known, including R132C (whose frequency in glioma patients is reportedly around 3% in the studied population, it was 3%), R132S (frequency in this work: 1%), and R132G and R132L (whose reported frequencies are both around 1%; neither was detected in this work). *IDH2* variants are less common, with R172K being observed in 3% of glioma patients (3% in our study), R172M (1% in our study), R172W (none in our study) and R172S (none in our study) having frequencies of ~1% each.²⁶ Our data agree with the previously reported stratification and frequency of *IDH* mutations in gliomas.

IDH1 status determination is crucial for diagnosis and selecting an appropriate treatment strategy. Typically, the first step in treating a glioma is to perform the safest radical resection that will provide enough tumor tissue for reliable diagnosis. Regardless of tumor grade, any glioma expressing wild type *IDH* should be regarded as a glioblastoma and treated with aggressive chemoradiotherapy according to the Stupp protocol. The treatment of gliomas expressing mutated variations of *IDH* should be guided by the presentation of clinical and molecular features. For radically resected low-grade tumors exhibiting both the 1p/19q co-deletion and an *IDH* mutation, one might even consider omitting oncotherapy altogether and simply recommend watchful follow-up.²⁷

As noted above, accurate determination of *IDH* status is vital for selecting effective treatment strategies for diffuse glioma patients and thus for their prognosis. The financial burden of diagnosing gliomas is increasing because of the multitude and complexity of current laboratory methods. WHO recommends testing all *IDH* negative samples from patients below 55 years old, in our study it was 63 patients of 275 (23%). IHC was analytically false negative for *IDH1* R132H in 4 specimens, and an additional 6 specimens had clinical false negative IHC by virtue of alternate *IDH1/2* mutations. The data validate the notion that while IHC is the standard method for detecting *IDH*, genetic sequencing should also be used to confirm negative IHC results and minimize the risk of false negatives. Using 2 different molecular approaches, this work confirmed the high incidence of *IDH1* variants in glioma patients below 55 years old.

The IHC determination of *IDH1* R132H mutation failed in 11/275 (4%) samples included in our cohort. This failure might be caused by laboratory errors or possible inadequate tissue handling. Therefore, second step control incorporating sequencing is fundamental for crucial genes involved in the molecular-histologic definition of gliomas.

This 2-step procedure could be applied also for other genes examined in gliomas like alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (*ATRX*) or telomerase reverse transcriptase (*TERT*).

After recent classification of tumors of the CNS and the development of MPS techniques, it starts to be feasible to use a glioma-tailored customized gene panels for understanding the molecular background.^{28,29} In our work, we showed that precision medicine information is increased even by testing *IDH1* and *IDH2* genes only. Our homemade Fast *IDH* MPS method shows concordant results as Nextera XT based method. For library preparation FAST *IDH* includes just 1 step (PCR amplification with purification, ~3 h in total) in contrast to Nextera XT method (1. PCR amplification with purification, 2. tagmentation and 3. indexing PCR amplification with purification, ~7 h in total) and the likelihood of the technical error is and hands-on time thus reduced. Overall Fast *IDH* method provides higher cost efficiency because of faster sample processing and will be licensed to a company to be available world-wide. Because of the high cost of sequencing chemistry we used in our laboratory the smallest flow-cell (MiSEQ nano) with pricing 380 to 500 euros to achieve cost efficiency of the method. Usually in routine diagnostics 2 to 4 samples for *IDH1/2* genotyping are sequenced in each run (once a week or every second week). Therefore it is necessary to combine *IDH1/2* sequencing with other sequencing genotyping methods such as *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* (colon cancer), *EGFR* and *BRAF* (lung cancer), or *BRCA1/2* (ovarian cancer). When sequencing 16 samples, the cost sequencing is around 30 euros per sample for both methods. About 15 euros per sample (half of total costs) includes library preparation, work cost along with running costs. Library preparation using Nextera XT costs around 50 euro per sample. When the fastIDH kit is commercially available, expected costs per sample are 30 to 60 euros. Total cost of *IDH1/2* sequencing would nowadays thus be about or even under 100 euro. This opens the question over the current validity of the model published by DeWitt in 2017²² which is based on 1800 USD (~1500 euros) as NGS costs. Although it might sound controversial, we assume that nowadays even tumors of patients over 55 years should be analyzed by MPS and gradually NGS could replace *IDH* IHC entirely. This data suggests that more than two-thirds of costs are saved and less common mutations and false negatives are revealed with appropriate efficacy. Limitation of our work is that we did not sequenced IHC wt samples of patients over 55 to see if there are any noncanonical or false negative samples.

CONCLUSION

The correct identification of diffuse gliomas is crucial for identifying appropriate tailored therapies. Gliomas are classified using the 2016 WHO system, which is based on the presence of validated biomarkers including *IDH* mutations and the 1p/19q co-deletion. We have shown that rare variants of *IDH1/2* occur in patients with CNS tumors, corroborating

previous findings. Our laboratory performs DNA sequencing of tumors identified as IDH1-negative by IHC in patients below 55 years old, and we recommend this approach to other laboratories interested in precise molecular diagnostics.

REFERENCES

- Perry A. WHO's arrived in 2016! An updated weather forecast for integrated brain tumor diagnosis. *Brain Tumor Pathol.* 2016;33:157–160.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131:803–820.
- Wessling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2018;44:139–150.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321:1807–1812.
- Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:932–941.
- Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009;462:739–744.
- Chen J-R, Yao Y, Xu H-Z, et al. Isocitrate dehydrogenase (IDH)1/2 mutations as prognostic markers in patients with glioblastomas. *Medicine (Baltimore).* 2016;95:e2583.
- Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, et al. IDH1/2 mutation is a prognostic marker for survival and predicts response to chemotherapy for grade II gliomas concomitantly treated with radiation therapy. *Int J Oncol.* 2012;41:1325–1336.
- Bals J, Meyer J, Mueller W, et al. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008;116:597–602.
- Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, et al. IDH1 mutations at residue p. R132 (IDH1^{R132}) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat.* 2009;30:7–11.
- Kang MR, Kim MS, Oh JE, et al. Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer.* 2009;125:353–355.
- Sanson M, Marie Y, Paris S, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol.* 2009;27:4150–4154.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360:765–773.
- Hartmann C, Meyer J, Bals J, et al. 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 Neuropathol.* 2009;118:469–474.
- Watanabe T, Vital A, Nobusawa S, et al. Selective acquisition of IDH1 R132C mutations in astrocytomas associated with Li-Fraumeni syndrome. *Acta Neuropathol.* 2009;117:653–656.
- Xu X, Zhao J, Xu Z, et al. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *J Biol Chem.* 2004;279:33946–33957.
- Camelo-Piragui S, Jansen M, Ganguly A, et al. A sensitive and specific diagnostic panel to distinguish diffuse astrocytoma from astrocytosis: chromosome 7 gain with mutant isocitrate dehydrogenase 1 and p53. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011;70:110–115.
- Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol.* 2015;129:867–873.
- Wang F, Travins J, DeLaBarre B, et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science.* 2013;340:622–626.
- Schumacher T, Bunse L, Pusch S, et al. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumor immunity. *Nature.* 2014;512:324–327.
- Chen L, Voronovich Z, Clark K, et al. Predicting the likelihood of an isocitrate dehydrogenase 1 or 2 mutation in diagnoses of infiltrative glioma. *Neuro Oncol.* 2014;16:1478–1483.
- Dewitt JC, Jordan JT, Froesch MP, et al. Cost-effectiveness of IDH testing in diffuse gliomas according to the 2016 WHO classification of tumors of the central nervous system recommendations. *Neuro Oncol.* 2017;19:1640–1650.
- Pinkham MB, Telford N, Whitfield GA, et al. FISHing tips: what every clinician should know about 1p19q analysis in gliomas using fluorescence in situ hybridisation. *Clin Oncol.* 2015;27:445–453.
- Fox E, Reid-Bayliss KS, Emond MJ, et al. Accuracy of next generation sequencing platforms. *Next Gener Seq Appl.* 2014;1:1000106.
- Lee SC. Diffuse gliomas for nonneuropathologists: the new integrated molecular diagnostics. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142:804–814.
- Arita H, Narita Y, Yoshida A, et al. IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2015;32:79–89.
- Weller M, van den Bent M, Tonn JC, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol.* 2017;18:e315–e329.
- Zacher A, Kaulich K, Stepanow S, et al. Molecular diagnostics of gliomas using next generation sequencing of a glioma-tailored gene panel. *Brain Pathol.* 2017;27:146–159.
- Nu K, Kim HS, Shim HS, et al. Targeted next-generation sequencing panel (TruSight Tumor 170) in diffuse glioma: a single institutional experience of 135 cases. *J Neurooncol.* 2019;142:445–454.

Article

The Influence of Gene Aberrations on Survival in Resected IDH Wildtype Glioblastoma Patients: A Single-Institution Study

Ondrej Kalita ^{1,*}, Zuzana Sporikova ^{2,†}, Marian Hajduch ², Magdalena Megova Houdova ², Rastislav Slavkovsky ², Lumir Hrabalek ¹, Matej Halaj ¹, Yvona Klementova ³, Martin Dolezel ³, Jiri Drabek ², Lucie Tuckova ⁴, Jiri Ehrmann, Jr. ⁴, Jana Vrbkova ², Radek Trojanec ² and Miroslav Vaverka ¹

- ¹ Department of Neurosurgery, University Hospital Olomouc, I.P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc, Czech Republic; lumir.hrabalek@fnol.cz (L.H.); matej.halaj@fnol.cz (M.H.); miroslav.vaverka@fnol.cz (M.V.)
- ² Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University in Olomouc, Hnevotinska 5, 779 00 Olomouc, Czech Republic; sporikovaz@gmail.com (Z.S.); marian.hajduch@fnol.cz (M.H.); magdalena.houdova-megova@lf1.cuni.cz (M.M.H.); rastislav.slavkovsky@upol.cz (R.S.); jiri.drabek@upol.cz (J.D.); jana.vrbkova@upol.cz (J.V.); radek.trojanec@fnol.cz (R.T.)
- ³ Department of Oncology, University Hospital Olomouc, I.P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc, Czech Republic; yvona.klementova@fnol.cz (Y.K.); martin.dolezel@fnol.cz (M.D.)
- ⁴ Department of Pathology and Laboratory of Molecular Pathology, University Hospital Olomouc, Hnevotinska 3, 779 00 Olomouc, Czech Republic; lucie.tuckova@fnol.cz (L.T.); jiri.ehrmann2@fnol.cz (J.E.J.)
- * Correspondence: ondrej.kalita@fnol.cz; Tel.: +420-588-442-777
- † Ondrej Kalita and Zuzana Sporikova have contributed equally to the article.



Citation: Kalita, O.; Sporikova, Z.; Hajduch, M.; Megova Houdova, M.; Slavkovsky, R.; Hrabalek, L.; Halaj, M.; Klementova, Y.; Dolezel, M.; Drabek, J.; et al. The Influence of Gene Aberrations on Survival in Resected IDH Wildtype Glioblastoma Patients: A Single-Institution Study. *Curr. Oncol.* **2021**, *28*, 1280–1293. <https://doi.org/10.3390/curroncol28020122>

Received: 28 February 2021

Accepted: 17 March 2021

Published: 21 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: This prospective population-based study on a group of 132 resected IDH-wildtype (IDH-wt) glioblastoma (GBM) patients assesses the prognostic and predictive value of selected genetic biomarkers and clinical factors for GBM as well as the dependence of these values on the applied therapeutic modalities. The patients were treated in our hospital between June 2006 and June 2015. Clinical data and tumor samples were analyzed to determine the frequencies of TP53, MDM2, EGFR, RB1, BCR, and CCND1 gene aberrations and the duplication/deletion statuses of the 9p21.3, 1p36.3, 19q13.32, and 10p11.1 chromosome regions. Cut-off values distinguishing low (LCN) and high (HCN) copy number status for each marker were defined. Additionally, MGMT promoter methylation and IDH1/2 mutation status were investigated retrospectively. Young age, female gender, Karnofsky scores (KS) above 80, chemoradiotherapy, TP53 HCN, and CCND1 HCN were identified as positive prognostic factors, and smoking was identified as a negative prognostic factor. Cox proportional regression models of the chemoradiotherapy patient group revealed TP53 HCN and CCND1 HCN to be positive prognostic factors for both progression-free survival and overall survival. These results confirmed the influence of key clinical factors (age, KS, adjuvant oncotherapy, and smoking) on survival in GBM IDH-wt patients and demonstrated the prognostic and/or predictive importance of CCND1, MDM2, and 22q12.2 aberrations.

Keywords: glioblastoma; biomarkers; multimodal therapy

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is a highly invasive tumor type that is not amenable to complete resection [1–3]. Consequently, patients with GBM have a poor prognosis, with a median survival of only about 12 months. Advanced age, male gender, Caucasian race, exposure to ionizing radiation, and smoking are considered risk factors for glioma development [4,5]. Conversely, clinical factors including young age, good performance status, gross total resection, and adjuvant treatment have been linked to superior prognosis among unselected GBM patients [6–9].

Glioblastomas can be classified based on their isocitrate dehydrogenase (IDH) status. GBM with wt IDH is characterized by tumor protein p53 (TP53) mutations, phosphatase

tensin homolog (PTEN) mutations and/or complete loss of chromosome 10, homozygous deletion of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2B (CDKN2A/CDKN2B), mutation or overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR), and/or gain of the 7p chromosome arm, platelet-derived growth factor receptor 1 (PDGFR1) mutations, neurofibromin 1 (NF1) mutations, E3 ubiquitin-protein ligase (MDM2) amplification, and methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation [10].

The objective of this population-based, single-center study was to determine the influence of selected genetic aberrations and clinical factors on survival in defined resected GBM IDH wt patients receiving different post-resection treatments. The WHO 2007 classifications initially used in the clinical setting were converted into WHO 2016 IDH status classifications in accordance with current recommendations [11,12].

2. Materials and Methods

2.1. Patients

Data on all glioma patients treated at the University Hospital in Olomouc, Czech Republic, have been collected prospectively and systematically since 2006. This work focuses on adult supratentorial IDH wt GBM patients who underwent resection and oncotherapy between June 2006 and June 2015. Information on the patients' clinical condition (KS, PS WHO, and smoking status) was collected along with imaging and histological data on the tumors and details of their cytogenetic alterations. All patients underwent early post-surgical MRI (within 72 h) to determine resection radicality. Nineteen patients received second-look surgery in the week after the initial procedure. Removal of at least 80% of the original tumor volume was considered to be the lowest acceptable resection radicality for inclusion in this study [13,14]. Based on semi-automatic MRI analyses, the extent of resection of the contrast-enhanced tumor was 84–100%, with a median of 85.6%. The median of the postoperative tumor volume was 2.9 cc. We have strived to perform standard aggressive oncotherapy in all patients. But in real clinical practice, only some patients are eligible to undergo Stupp protocol. Many patients have progressed before and at the initial period of oncotherapy. We separated two groups of patients named No Therapy and Chemoradiotherapy. Finally, we singled out patients that were eligible to go through, only semi-palliative treatment strategy characterized by sole radiotherapy ranged from 34 to 60 Gy [15]. The stratification of the cohort based on the applied oncologic treatment strategy is shown in Figure 1. Following resection, patients received periodic checkups with MRI every 3 months until death.

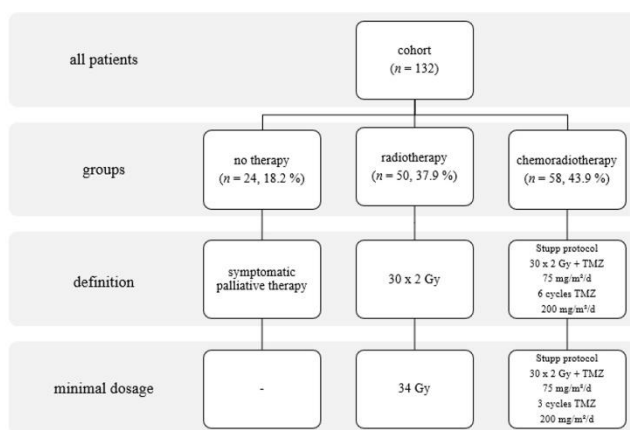


Figure 1. Stratification of the cohort based on treatment modality, with details of the applied treatments.

Tumor tissue samples were collected in both formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and fresh-frozen form. Clinical and MRI follow-up information was gathered at regular three-monthly intervals. Smoking status was obtained from the clinic's preoperative questionnaire. Patients were classified as non-smokers (83/132 = 62.9%) if they had never smoked or had quit smoking at least five years before diagnosis; the remaining patients (49/132 = 37.1%) were classified as smokers. All of the tumors were classified according to the latest WHO classification of CNS tumors by two local neuropathologists. Immunohistochemical analysis of IDH1 R132H and Ki67 status was included in the standard classification procedure. All patients signed informed consent forms.

2.2. Immunohistochemical Determination of IDH1 R132H Status

The study cohort consisted of GBM patients with IDH wildtype status according to the WHO 2016 diagnostic criteria. The 1–2 µm thick tissue sections were pre-treated using the PT Link system (Agilent, Santa Clara, CA, USA) at 97 °C, pH 9 for 20 min to ensure epitope retrieval. Hydrogen peroxide was used to block endogenous peroxidase activity. The sections were subsequently treated with the primary antibody, Anti-IDH1R132H clone H09 (Dianova, Hamburg, Germany), at a dilution of 1:100 for 20 min at room temperature. EnVision Flex+, Mouse, High pH (Agilent DAKO) was used to amplify the primary antibody signal. The sections were then treated for 20 min with the secondary antibody, EnVision Flex/HRP (Agilent DAKO), after which the reaction was visualized using the DAB+ Substrate Chromogen System (Agilent DAKO).

2.3. Immunohistochemical Determination of Ki67 Status

The 1–2 µm thick tissue sections were microwaved in citrate buffer (pH 6) for 10 min at 120 °C to ensure antigen retrieval. Hydrogen peroxide was used to block endogenous peroxidase activity (Mouse/Rabbit ImmunoDetector DAB HRP Brown System, Bio SB, Santa Clara, CA, USA). The sections were subsequently treated for 30 min with the primary antibody, Ki67 antigen, MIB-1 (Agilent DAKO), at a dilution of 1:200. After treatment with the secondary antibody (Mouse/Rabbit ImmunoDetector DAB HRP Brown System, Bio SB) for 30 min, the reaction was visualized using DAB+ Substrate Chromogen.

2.4. IDH1 R132 and IDH2 R172 Genotyping

DNA was isolated using a Roche Cobas® kit and a Cobas® DNA sample preparation kit following the manufacturer's instructions. qPCR amplification was performed using 1 µL or 5 µL total DNA (depending on whether the DNA concentration was >30 ng/µL or >10 ng/µL) with Thermo-Start Taq DNA Polymerase 1U (ThermoFisher Scientific, Weltham, MA, USA), 10X PCR Thermo-Start Buffer (ThermoFisher Scientific), MgCl₂ (ThermoFisher Scientific), dNTPs (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA), and EvaGreen 20x (Biotium, Fremont, CA, USA). The conditions used for multiplex PCR amplification (IDH1 and IDH2 reactions) were as follows: 95 °C for 2 min 15 s, then 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 62 °C, and 30 s at 72 °C (FAM channel fluorescence scanning), followed by a final incubation for 5 min at 72 °C and melting from 60 °C to 95 °C while scanning fluorescence in the FAM channel at 0.5 °C. After amplification, the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used to purify amplicons. The product concentration was determined using the Qubit 2.0 HS DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The sequencing library was diluted and denatured with 0.1 M NaOH (DNA concentration: 10 µM). The library contained approximately equal quantities of each sample. Sequencing was performed with the Illumina MiSeq platform using the MiSeq V2 Nano 300 bp or V3 150 bp sequencing kit and 2 × 75 bp sequencing reads. Sequencing results were analyzed using the Somatic Variant Caller function of the MiSeq Reporter software package. Output vcf files were processed using Excel (Microsoft, Redmont, WA, USA). Mutations in the IDH1 and IDH2 genes were identified by searching for mutations in codons 132 and 172 with frequencies >5% and coverage values >1000.

2.5. FISH Analysis

FISH analysis was performed on FFPE tissues according to the manufacturer's instructions with LSI 1p36.3, LSI 1q25.2, LSI 9p21.3, LSI 19q13, LSI EGFR, LSI CEP7, LSI MDM2, LSI 10p11.1, LSI BCR, LSI 22q12.2, and LSI CCND1 probes from IntelliMed, Ltd. (Olomouc, Czech Republic) as well as LSI TP53, LSI RB1, and LSI 13q12.11 probes from Vysis (Lake County, IL, USA). Signals were detected and quantified using fluorescence microscopy. At least 100 non-overlapping nuclei were inspected in each sample.

2.6. Setting Copy Number Cutoff Values

Current therapeutic protocols for gliomas lack standard cutoff values for molecular aberrations. Therefore, a specific cut-off value for each molecular marker was defined by selecting the best cut-off value found in our dataset using the maxstat function (maxstat R package, ver. 0.7–25) and the surv_cutpoint function (survminer R package, ver. 0.4.3) with the default value of 0.1 for the minprop parameter (representing the minimal proportion of observations per group) and data on progress-free survival (time and event). Two patient groups were defined for each marker: a low copy number (LCN) group comprising patients with copy numbers equal to or below the estimated cutoff value, and a high copy number (HCN) group comprising patients with copy numbers exceeding the cutoff value.

2.7. MGMT Methylation Status

Bisulfite conversion of template DNA was performed using the EZ DNA methylation Gold Kit according to the manufacturer's instructions (Zymo Research, Irvine, CA, USA) immediately after extracting DNA from glioma tissue samples using the DNA Sample Preparation Kit (Roche, Pleasanton, CA, USA). MGMT methylation was then detected using MethyLight real-time methylation-specific PCR. To verify DNA integrity and the quality of the bisulfite conversion and the PCR reaction, the methylation of CDH1 (E-cadherin) and Alu-M5 was analyzed in parallel with that of MGMT, and a commercial methylated and bisulfite-converted DNA standard (Zymo Research) was analyzed as a control alongside all DNA extracts from tissue samples.

Each 10 µl PCR reaction mixture for detection of MGMT, E-cadherin, and Alu-M5 promoter methylation contained 1x PCR buffer (Qiagen, Hilden, Germany), 1 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 U HotStarTaq (Qiagen, Hilden, Germany), and the relevant primers and probe (Table 1). The PCR program involved denaturation at 95 °C for 15 min then 40 cycles of 95 °C for 30 s, 65 °C for 50 s, and 72 °C for 60 s.

Table 1. Primers and probes used to detect MGMT, E-cadherin, and Alu-M5 promoter methylation.

Gene	Primer	DNA Sequence	Final Concentration (µM)
MGMT promoter methylation	Forward	5'-CGAATATACTAAAACAACCCGCG-3'	1.0
	Reverse	5'-GTATTTTTCGGGAGCGAGGC-3'	1.0
	Probe	FAM-BHQ-CAAATCCTCGGATACGCACCGTTTACG	0.2
E-cadherin promoter methylation	Forward	5'-AATTTTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT-3'	1.0
	Reverse	5'-TCCCCAAAACGAACTAACGAC-3'	1.0
	Probe	FAM-BHQ-CGCCACCCGACCTCGCAT	0.2
Alu-M5 promoter methylation	Forward	5'-GGTATGATGGCGTATGTTGT-3'	0.17
	Reverse	5'-GACTCACCACAACCTCCAC-3'	0.17
	Probe	FAM-BHQ-AAACGATTCTCCTACCTCAACCTCCCGAA	0.03

2.8. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using R Statistical Software, version 4.0.3 (www.r-project.org), accessed date 9 November 2020. Pearson's chi-square and Fisher's exact tests were used for testing associations between a type of therapy and molecular markers value levels. Overall survival (OS) and progress-free survival were estimated using the Kaplan-Meier method (presented as medians in tables of results). The OS range

extended from the day of the first surgery until death or last follow-up. The PFS range extended from the day of the first surgery until MRI tumor progression. The influence of each molecular marker on OS, resp. PFS was investigated using Cox proportional hazard models, both with one factor (a univariate model—Table S1, Figures 2 and 3) as well as adjusted for the major clinical prognostic factors (a multivariate model—Table S2), i.e., a categorized age at diagnosis (≤ 55 vs. >55 years) and a categorized Karnofsky score (KS; <80 vs. ≥ 80), in therapy-subgroups of patients. The influence of each factor on OS, resp. PFS across groups of all patients was investigated by the Cox proportional hazard model (one for each marker) stratified by therapy and adjusted for categorized age and categorized Karnofsky score (Table S3).

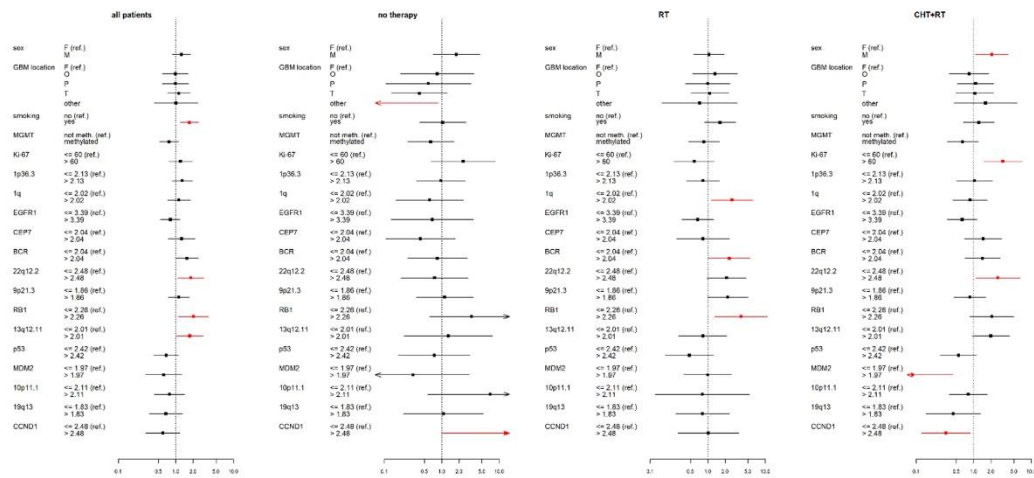


Figure 2. Results of the multivariate Cox proportional hazard models of overall survival (OS) for studied variables (selected clinical factors and molecular markers) in therapy subgroups, expressed using a hazard ratio (a square point—the point estimation, a line segment corresponding to the 95% confidence interval; in case of wider interval than presented scale the arrow is used) for each level of presented factors. The reference category of each factor is labeled with “(ref.)”. Each factor was analyzed in a separate model with adjusting variables—categorized age and Karnofsky score (HRs are not presented). Significant results ($p < 0.05$) are shown in red; the dotted line indicates a hazard ratio of 1. RT—radiotherapy; CHT+RT—chemoradiotherapy; F—female; M—male; F—frontal; O—occipital; P—parietal; T—temporal; BCR—breakpoint cluster region; EGFR1—epidermal growth factor receptor 1; RB1—retinoblastoma gene 1; TP53 - tumor protein P53; MDM2—mouse double minute 2 homolog; CCND1—cyclin D1; MGMT - O6-methylguanine-DNA methyltransferase.

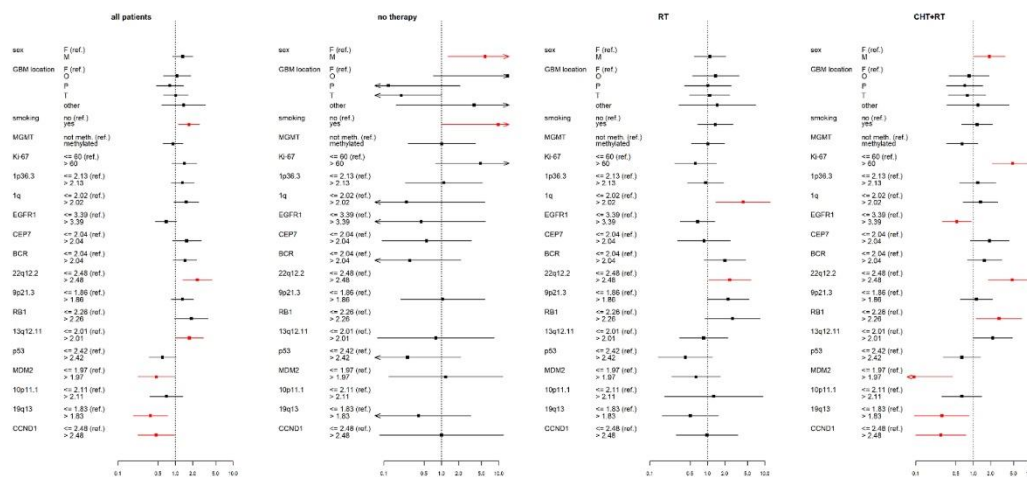


Figure 3. Results of the multivariate Cox proportional hazard models of progression-free survival (PFS) for studied variables (selected clinical factors and molecular markers) in therapy subgroups, expressed using a hazard ratio (a square point—the point estimation, a line segment corresponding to the 95% confidence interval; in case of wider interval than presented scale the arrow is used) for each level of presented factors. The reference category of each factor is labeled with “(ref.)”. Each factor was analyzed in a separate model with adjusting variables—categorized age and Karnofsky score (HRs are not presented). Significant results ($p < 0.05$) are shown in red; the dotted line indicates a hazard ratio of 1. RT—radiotherapy; CHT+RT—chemoradiotherapy; F—female; M—male; F—frontal; O—occipital; P—parietal; T—temporal; BCR—breakpoint cluster region; EGFR1—epidermal growth factor receptor 1; RB1—retinoblastoma gene 1; TP53—tumor protein P53; MDM2—mouse double minute 2 homolog; CCND1—cyclin D1; MGMT—O6-methylguanine-DNA methyltransferase.

3. Results

3.1. Baseline Patient Characteristics

The studied GBM IDH wt cohort comprised 132 patients who had undergone resection. Each patient was followed up at 3-monthly intervals until their death; the median follow-up period was 7.6 months (1.0–113.7 months). Table 2 summarizes the clinical characteristics of the patients (gender, age, KS, location, smoking, and adjuvant therapy) and their molecular cytogenetic characteristics, namely their high or low copy number (HCN or LCN) status with respect to the studied genetic aberrations and their MGMT promoter methylation status.

Table 2. Demographic data for the patient cohort and information on the prevalence of low and high copy numbers of the studied markers.

Characteristics	Level	No Therapy	RT	CHT+RT	All Patients
Gender	F	10/24 (41.7%)	25/50 (50%)	17/58 (29.3%)	52/132 (39.4%)
	M	14/24 (58.3%)	25/50 (50%)	41/58 (70.7%)	80/132 (60.6%)
GBM location	F	8/24 (33.3%)	14/50 (28%)	20/58 (34.5%)	42/132 (31.8%)
	O	3/24 (12.5%)	10/50 (20%)	10/58 (17.2%)	23/132 (17.4%)
	P	2/24 (8.3%)	9/50 (18%)	13/58 (22.4%)	24/132 (18.2%)
	T	10/24 (41.7%)	15/50 (30%)	12/58 (20.7%)	37/132 (28%)
	other	1/24 (4.2%)	2/50 (4%)	3/58 (5.2%)	6/132 (4.5%)
Smoker *	No	9/24 (37.5%)	33/50 (66%)	41/58 (70.7%)	83/132 (62.9%)
	Yes	15/24 (62.5%)	17/50 (34%)	17/58 (29.3%)	49/132 (37.1%)
MGMT	Not methylated	16/23 (69.6%)	31/48 (64.6%)	33/52 (63.5%)	80/123 (65%)
	Methylated	7/23 (30.4%)	17/48 (35.4%)	19/52 (36.5%)	43/123 (35%)

Table 2. Cont.

Characteristics	Level	No Therapy	RT	CHT+RT	All Patients
Age category *	≤55	2/24 (8.3%)	2/50 (4%)	19/58 (32.8%)	23/132 (17.4%)
	>55	22/24 (91.7%)	48/50 (96%)	39/58 (67.2%)	109/132 (82.6%)
Karnofsky score *	0–79	16/24 (66.7%)	18/50 (36%)	12/58 (20.7%)	46/132 (34.8%)
	80–100	8/24 (33.3%)	32/50 (64%)	46/58 (79.3%)	86/132 (65.2%)
Ki67	≤60	20/24 (83.3%)	41/49 (83.7%)	49/58 (84.5%)	110/131 (84%)
	>60	4/24 (16.7%)	8/49 (16.3%)	9/58 (15.5%)	21/131 (16%)
1q CN	≤2.02	5/15 (33.3%)	12/33 (36.4%)	13/39 (33.3%)	30/87 (34.5%)
	>2.02	10/15 (66.7%)	21/33 (63.6%)	26/39 (66.7%)	57/87 (65.5%)
22q CN	≤2.48	13/16 (81.2%)	30/39 (76.9%)	33/41 (80.5%)	76/96 (79.2%)
	>2.48	3/16 (18.8%)	9/39 (23.1%)	8/41 (19.5%)	20/96 (20.8%)
CEP7 CN	≤2.04	4/16 (25%)	4/41 (9.8%)	10/50 (20%)	18/107 (16.8%)
	>2.04	12/16 (75%)	37/41 (90.2%)	40/50 (80%)	89/107 (83.2%)
BCR CN	≤2.04	6/15 (40%)	11/31 (35.5%)	14/39 (35.9%)	31/85 (36.5%)
	>2.04	9/15 (60%)	20/31 (64.5%)	25/39 (64.1%)	54/85 (63.5%)
EGFR1 CN	≤3.39	6/16 (37.5%)	25/44 (56.8%)	26/53 (49.1%)	57/113 (50.4%)
	>3.39	10/16 (62.5%)	19/44 (43.2%)	27/53 (50.9%)	56/113 (49.6%)
9p21.3 CN	≤1.86	6/17 (35.3%)	10/41 (24.4%)	16/49 (32.7%)	32/107 (29.9%)
	>1.86	11/17 (64.7%)	31/41 (75.6%)	33/49 (67.3%)	75/107 (70.1%)
1p36.3 CN	≤2.13	12/20 (60%)	29/45 (64.4%)	43/52 (82.7%)	84/117 (71.8%)
	>2.13	8/20 (40%)	16/45 (35.6%)	9/52 (17.3%)	33/117 (28.2%)
13q12.11 CN	≤2.01	3/10 (30%)	6/31 (19.4%)	14/41 (34.1%)	23/82 (28%)
	>2.01	7/10 (70%)	25/31 (80.6%)	27/41 (65.9%)	59/82 (72%)
RB1 CN	≤2.26	14/16 (87.5%)	37/42 (88.1%)	42/49 (85.7%)	93/107 (86.9%)
	>2.26	2/16 (12.5%)	5/42 (11.9%)	7/49 (14.3%)	14/107 (13.1%)
P53 CN	≤2.42	14/18 (77.8%)	38/44 (86.4%)	41/52 (78.8%)	93/114 (81.6%)
	>2.42	4/18 (22.2%)	6/44 (13.6%)	11/52 (21.2%)	21/114 (18.4%)
10p11.1	≤2.11	13/14 (92.9%)	33/36 (91.7%)	35/47 (74.5%)	81/97 (83.5%)
	>2.11	1/14 (7.1%)	3/36 (8.3%)	12/47 (25.5%)	16/97 (16.5%)
19q13 CN	≤1.83	2/18 (11.1%)	4/43 (9.3%)	4/53 (7.5%)	10/114 (8.8%)
	>1.83	16/18 (88.9%)	39/43 (90.7%)	49/53 (92.5%)	104/114 (91.2%)
MDM2 CN	≤1.97	1/17 (5.9%)	5/42 (11.9%)	3/51 (5.9%)	9/110 (8.2%)
	>1.97	16/17 (94.1%)	37/42 (88.1%)	48/51 (94.1%)	101/110 (91.8%)
CCND1 CN	≤2.48	12/14 (85.7%)	29/32 (90.6%)	40/47 (85.1%)	81/93 (87.1%)
	>2.48	2/14 (14.3%)	3/32 (9.4%)	7/47 (14.9%)	12/93 (12.9%)

* test of independence (chi-squared or Fisher exact test), p -value < 0.05; RT—radiotherapy; CHT+RT—chemoradiotherapy; F—female; M—male; F—frontal; O—occipital; P—parietal; T—temporal; BCR—breakpoint cluster region; EGFR1—epidermal growth factor receptor 1; RB1—retinoblastoma gene 1; TP53—tumor protein P53; MDM2—mouse double minute 2 homolog; CCND1—cyclin D1; MGMT—O6-methylguanine-DNA methyltransferase.

3.2. IDH wt GBM Patients Receiving Chemoradiotherapy

Multivariate analysis revealed a significant link between gender and survival among patients receiving chemoradiotherapy. Male gender had negative impacts on PFS (HR = 1.9; p = 0.046) and OS (HR = 2.1; p = 0.03).

High Ki67 expression was associated with shorter OS (median = 7.9 months vs. 15 months for lower expression of Ki67; HR = 2.9, p = 0.005) and PFS (median = 4.4 months vs. 9.6 months for lower expression of Ki67; HR = 4.5, p = <0.001) in the chemoradiotherapy group. The same effect was observed in the case of the Cox model adjusted for categorized age and Karnofsky score (HR(OS) = 3.2, p -value = 0.003; HR(PFS) = 4.8, p -value < 0.001).

Furthermore, 22q12.2 HCN patients had shorter PFS than their LCN counterparts (median = 6.1 months vs. 9.7 months; p = 0.006), which was confirmed by multivariate

analysis (HR = 4.8; $p = 0.002$). The multivariate analysis adjusted for age and Karnofsky score also indicated that 22q12.2 HCN is linked with a poor OS (HR = 2.6; $p = 0.033$).

CCND1 HCN predicted longer PFS in the chemoradiotherapy group (median = 13.3 months vs. 6.9 months in CCND1 LCN patients; $p = 0.015$) and was associated with reduced relative risk (HR = 0.3; $p = 0.011$). CCND1 HCN was also associated with longer OS (median = 18.9 months vs. 13.6 months for CCND1 LCN; $p = 0.029$), which was confirmed by a low HR (HR = 0.3, $p = 0.026$).

19q13 HCN status was associated with longer PFS (median = 8.9 months vs. 5.5 months for 19q13 LCN; $p = 0.037$) and reduced relative risk (HR = 0.3; $p = 0.025$).

MDM2 HCN was significantly associated with longer PFS (median = 8.8 months vs. 3.9 months in MDM2 LCN patients; $p < 0.001$) and OS (median = 14.8 months vs. 5.2 in MDM2 LCN patients; $p < 0.001$) in the chemoradiotherapy group. This finding was supported by the multivariate analysis: the HR of MDM2 was below unity for both PFS (HR = 0.1; $p = 0.002$) and OS (HR = 0.1; $p = 0.003$).

Finally, p53 HCN was significantly associated with longer OS (median = 18.9 months vs. 13.6 in p53 LCN; $p = 0.032$) in the chemoradiotherapy group, although this finding was not confirmed by multivariate analysis. However, multivariate analysis did indicate a possible link between RB1 HCN and PFS (HR = 2.8; $p = 0.026$) in this patient group.

3.3. IDH wt GBM Patients Receiving Radiotherapy

1q HCN was significantly associated with decreased OS (median = 3.9 months vs. 8.9 months in 1q LCN patients; $p = 0.022$) and PFS (median = 2.7 months vs. 4.6 months in 1q LCN patients; $p = 0.019$) as well as a high relative risk (HR) with respect to both OS (HR = 2.7; $p = 0.022$) and PFS (HR = 4.2; $p = 0.01$) in the radiotherapy patient group based on multivariate models.

22q12.2 HCN was found to be a negative prognostic factor of PFS (median PFS was 2.3 months vs. 3.6 in 22q12.2 LCN patients; $p = 0.042$). The multivariate model for this marker confirmed an increased relative risk (HR = 2.4; $p = 0.038$).

BCR HCN was associated with shorter OS (median = 5.3 months vs. 8.5 months in BCR LCN patients; $p = 0.039$), which was confirmed by the multivariate analysis (HR = 2.4; $p = 0.042$).

RB1 HCN was also associated with shorter OS (median = 3.6 months vs. 6.9 in RB1 LCN patients; $p = 0.012$), and this association was confirmed by its relative risk estimate (HR = 3.8; $p = 0.013$).

3.4. IDH wt GBM Patients with No Therapy

Because the group with untreated wt-GBM comprised only 24 patients, some parameters could not be calculated. Nevertheless, male gender was associated with reduced PFS (median = 0.6 vs. 1.7 months in females; $p = 0.015$) in this group, which was confirmed by a higher relative risk estimate (HR = 5.7; $p = 0.02$).

A history of smoking was also associated with shorter PFS among patients not receiving therapy (median = 0.7 vs. 1.8 months for non-smokers; $p = 0.036$), but the multivariate analysis did not confirm this finding.

CCND1 HCN was linked to shorter OS (median = 1.3 months vs. 3.1 months in CCND1 LCN patients; $p = 0.043$) in the untreated group and had a HR considerably greater than unity (HR = 12.8; $p = 0.049$). However, the reliability of these values is limited by the low number of cases.

3.5. Statistical Data for the Complete IDH wt GBM Cohort

To reveal the influence of each factor on OS, resp. PFS across all therapy-subgroups Cox models stratified by type of applied therapy and adjusted for categorized age and Karnofsky score were fitted. Results showed a higher relative risk estimate for the male gender (HR = 1.6; $p = 0.029$). RB1 HCN was found to be a negative marker for both OS (HR = 2.5; $p = 0.003$) and PFS (HR = 2.6; $p = 0.006$). CCND1 HCN was linked to decreased

estimated HR (HR = 0.4; $p = 0.034$) and also for 19q13 HCN, the same impact was observed (HR = 0.4; $p = 0.012$). EGFR1 HCN was also associated with reduced OS (HR = 0.6; $p = 0.024$) along with PFS (HR = 0.6; $p = 0.007$). Additionally, P53 HCN significantly decreased the relative risk with respect to both OS (HR = 0.5; $p = 0.019$) and PFS (HR = 0.5; $p = 0.02$).

3.6. Summary of Results

The group with only radiotherapy: Strong negative prognostic factors of OS such as 1q HCN, BCR HCN, and RB1 HCN were confirmed in this group and, furthermore 1q HCN and 22q12.2 HCN was found to be a significant negative prognostic factor of PFS.

The group with chemoradiotherapy: Negative clinical factors in the chemoradiotherapy group were male gender, high Karnofsky score, older age, higher expression of Ki67, and 22q12.2 HCN status. On the other hand, genetic markers such as CCND1 HCN, 19q13 HCN, MDM2 HCN, and p53 HCN indicate a positive influence on both OS and PFS in the chemoradiotherapy group.

The group with no therapy: Although the group of patients comprised only a small number of participants, male gender, smoking status, and CCND1 HCN were marked as negative prognostic factors in this group.

All patient cohort: Male gender, RB1 HCN, and 22q12.2 were confirmed to be negative prognostic markers in the group of all patients. On the contrary, EGFR1 HCN, p53 HCN, CCND1 HCN, and 19q13 HCN were positive prognostic factors.

4. Discussion

Despite considerable efforts to clarify the molecular basis of GBM, the functional roles of known key genes and molecular markers are still unclear [16–18]. Previous studies have sought to identify distinct molecular signatures of diffuse gliomas and thereby reveal clinically relevant or functionally distinct GBM subclasses, but clinical applications for such signatures remain largely elusive [19–23]. Another problem is that genetic abnormalities have been defined rather ambiguously in many previous studies. Furthermore, most previous studies included patients who had undergone biopsy as well as resection [6,24–27], whereas our study examined only patients who underwent resection with the defined radicality. This should reduce heterogeneity and help reveal the effects of specific genetic factors. Analysis of patient records indicated that the main reason for omitting oncotherapy was poor neurological status (KS < 60) after surgery. Indications for sole radiotherapy and interruption of preliminary chemoradiotherapy were poor neurological status (KS \approx 60) after surgery and rapid clinical deterioration during oncotherapy. Because the group of patients not receiving oncological treatment was very small ($n = 24$), the multivariate analysis for this group did not converge adequately and it was not possible to obtain HR values for OS or PFS.

The best outcomes for glioma patients are achieved through aggressive multimodal therapy involving safe and maximal resection followed by chemoradiotherapy [28]. In the studied cohort, every eligible patient who had undergone defined resection was reevaluated for oncotherapy suitability.

Each of the groups was distinguished by the survival and an occurrence of the prognostic factors. GBM wt patients receiving no oncological treatment or only radiotherapy are characterized by poor prognosis with substantial tumor growth [29]. Accordingly, our statistical analysis revealed very few positive prognostic factors in the group without oncotherapy. We, therefore, conclude that the course of the disease is effectively predetermined. This highlights the urgent need for new treatment strategies.

The main goal of most reported GBM studies has been to identify clinically relevant biomarkers with potential applications in medical practice, such as IDH [11]. In this work, we focused on selected genetic markers in an IDH wt GBM patient cohort and investigated their influence on disease evolution and its dependence on therapeutic modality.

CCND1 HCN emerged as a clear positive marker of prolonged OS and PFS in the chemoradiotherapy group, although the opposite was observed in patients receiving

neither chemotherapy nor radiotherapy. This could be due to increased chemosensitivity in tumors with elevated expression of this gene [30]. The CCND1 gene regulates the G1-S cell cycle phase transition and is thus involved in regulating cell proliferation and differentiation [31].

Increased MDM2 expression is known to block p53 activity, leading to uncontrolled glial cell proliferation and brain oncogenesis [31]. Surprisingly, our results indicated that MDM2 amplification had positive effects on survival in both the chemoradiotherapy group and the full patient cohort. Additionally, p53 amplification had positive effects on survival in all studied patient groups. This strongly suggests that the p53-MDM2 regulatory loop is involved in gliomagenesis which is known to be a complex process.

Our results also revealed a negative effect of 22q12.2 polysomy on PFS across groups, which may warrant further investigation. Negative effects of loss of 22q on glioma progression have been reported previously [32–34], and 22q12.2 polysomy was identified as a malignant component in a study on ganglioglioma. Interestingly, this chromosomal region contains the EWSR1 gene, which causes Ewing sarcoma as well as neuroectodermal and other tumors [35,36].

The 1p/19q codeletion is a signature of oligodendroglioma, which has a relatively good prognosis. Additionally, GBM is often characterized by co-gain of chromosomes 1/19 and 19/20, both of which have been linked to superior outcomes [37,38]. However, this effect was not observed in our cohort, possibly because of the opposing effects of other genetic aberrations with negative effects on prognosis, such as EGFR1 amplification [39].

Pyrosequencing studies have shown that extensive MGMT methylation is associated with longer OS and PFS in GBM IDH wt patients, suggesting a possible beneficial effect of DNA alkylating chemotherapeutic strategies [40,41]. Marchi et al. showed that MGMT methylation extended OS and PFS in patients who had undergone gross total resection followed by adjuvant chemoradiotherapy. However, no such effect was observed when comparing our cohort of resected GBM patients receiving chemoradiotherapy to the other patient groups examined herein, even though the same molecular analysis protocol was used in both cases [42]. MGMT methylation status did not affect the clinical treatment given to the GBM patients; the Stupp protocol was considered the gold standard regardless of MGMT methylation.

To our knowledge, no previous publications on GBM included cut-off values for the markers considered here. Therefore, an important objective of this work was to establish LCN and HCN values for each marker that could be used in subsequent studies in this area.

Our results confirmed the prognostic value of clinical factors such as age, KS, smoking, and the applied therapeutic modalities. The effect of smoking may be partly due to nicotine-induced stimulation of malignancy in glioma cells, as suggested by a recent experimental study. However, other studies on this topic have yielded more ambiguous results [4,5,43]. Our results indicate that smoking is associated with shorter OS and PFS in all patient groups. The smokers in the patient cohort were predominantly male, which may explain the observed effect of gender on OS and PFS: males exhibited shorter survival than females. This effect warrants further investigation.

This study focused on the dominant IDH wt group of GBM patients, who have a very unfavorable prognosis. We confirmed the heterogeneity of IDH wt glioblastomas and investigated how differences in their molecular backgrounds influence survival. Although a standard chemotherapy regime (the Stupp protocol) is currently recommended for all GBM IDH wt patients, the optimal therapeutic strategy remains unknown. Understanding how various biomarkers predict treatment responses and outcomes will be vital for developing effective personalized treatment strategies for GBM patients [17,22,23,44].

5. Conclusions

Many studies have investigated prognostic factors for GBM patients with IDH mutations, for which prognosis is comparatively favorable. But the more frequent and deadlier IDH wt tumors have received less attention. We studied a cohort of IDH wt glioblastoma

patients whose IDH status was determined in accordance with the WHO recommendations of 2016 [11,12]. The initial treatment strategy for this cohort was maximal radical and safe tumor resection, if possible, followed by oncotherapy. IDH wt gliomas have traditionally been regarded as a homogenous and unfavorable histological subtype with limited response to oncotherapy, making nihilistic management preferable. However, clinical outcomes for this diffuse glioma type are actually characterized by vast heterogeneity. The GBM wt subgroups with the poorest prognosis were characterized by an absence of positive prognostic factors and rapid tumor growth. Patients in these subgroups were those who received no oncotherapy or only radiotherapy. A crucial question of this study was: “How did pre-existing factors in resected GBM wt modify patient eligibility for a followed oncotherapy?” Our aim was to identify clinical and biologically relevant prognostic factors for IDH wt GBM, to propose biological mechanisms explaining why these factors affect prognosis, and to identify clinically relevant IDH wt GBM subgroups. Knowledge of such factors and their impact on prognosis could facilitate decision-making about how aggressive the oncological strategy for a given patient should be, and whether reoperation is warranted, among other things. As such, the results presented here represent a first step towards the personalization of treatment for IDH wt GBM patients because they relate specific molecular markers to survival in this patient cohort.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1718-7729/28/2/122/s1>, Table S1: The influence of various parameters on OS and PFS in the full patient cohort and subgroups receiving specific treatment modalities based on a univariate Cox proportional hazard regression model and Kaplan-Meier estimates. Table S2: Hazard ratios measuring the influence of the analyzed demographic variables and markers on OS and PFS based on multivariate Cox proportional regression models with adjustments for the prognostic factors of age at diagnosis (≤ 55 as reference category vs. >55 years) and KS (≤ 80 as reference category vs. >80). Table S3: Results of fitted Cox proportional hazard models of OS, resp. PFS for selected clinical factors and molecular markers stratified by therapy and adjusted for categorized Karnofsky score and age. For each model and non-reference category, the hazard ratio estimates (point estimate as well as 95%-confidence interval) and *p*-value are presented. Column N represents the number of patients in each factor level subgroup. Results for adjusting factors are not presented. Significant results are red-colored.

Author Contributions: Conceptualization: O.K., Z.S., M.M.H., R.S., L.T. and M.H. (Matej Halaj); Methodology: O.K., Z.S., R.S., J.V., L.T., M.H. (Marian Hajduch), R.T. and J.D.; Writing—original draft preparation: Z.S., O.K., R.S., J.V. and L.T.; Writing—revised draft preparation: O.K., Z.S., J.V.; Data curation, M.H. (Marian Hajduch), Y.K., M.D.; Supervision: O.K., L.H., J.E.J., J.V. and M.V.; Funding acquisition: O.K., M.H. (Marian Hajduch), L.H. and M.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministry of Health of the Czech Republic [grant NV19-04-00281 and grant NU21-03-00195], BMRI-CZ [grant LM2018125], Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic [grant LM2018132], and the European Regional Development Fund—Project ENOCH [CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868].

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Due to privacy and confidentially patient data is not available. Part of the data was presented at the European Association of Neuro-Oncology (EANO) Annual virtual meeting in October, 2016.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Cavenee, W.K.; Burger, P.C.; Jouvet, A.; Scheithauer, B.W.; Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **2007**, *114*, 97–109. Available online: <http://pmc/articles/PMC1929165/?report=abstract> (accessed on 23 October 2020). [CrossRef]
- Thakkar, J.P.; Dolecek, T.A.; Horbinski, C.; Ostrom, Q.T.; Lightner, D.D.; Barnholtz-Sloan, J.S.; Villano, J.V. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2014**, *23*, 1985–1996. Available online: <http://pmc/articles/PMC4185005/?report=abstract> (accessed on 14 November 2020). [CrossRef] [PubMed]
- Dunn, G.P.; Rinne, M.L.; Wykosky, J.; Genovese, G.; Quayle, S.N.; Dunn, I.F.; Agarwalla, P.K.; Chheda, M.G.; Campos, B.; Wang, A.; et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 756–784. Available online: <http://pmc/articles/PMC3337451/?report=abstract> (accessed on 14 November 2020). [CrossRef]
- Braganza, M.Z.; Rajaraman, P.; Park, Y.; Inskip, P.D.; Freedman, N.D.; Hollenbeck, A.R.; De González, A.B.; Kitahara, C.M. Cigarette smoking, alcohol intake, and risk of glioma in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Br. J. Cancer* **2013**, *110*, 242–248. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24335921/> (accessed on 14 November 2020). [CrossRef]
- Hou, L.; Jiang, J.; Liu, B.; Han, W.; Wu, Y.; Zou, X.; Nasca, P.C.; Xue, F.; Chen, Y.; Zhang, B.; et al. Smoking and adult glioma: A population-based case-control study in China. *Neuro Oncol.* **2016**, *18*, 105–113. Available online: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article-lookup/doi/10.1093/neuonc/nov146> (accessed on 12 December 2020). [CrossRef]
- Stupp, R.; Hegi, M.E.; Mason, W.P.; Bent, M.J.V.D.; Taphoorn, M.J.B.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 459–466. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19269895/> (accessed on 24 October 2020). [CrossRef]
- Liang, J.; Lv, X.; Lu, C.; Ye, X.; Chen, X.; Fu, J.; Luo, C.; Zhao, Y. Prognostic factors of patients with Gliomas—An analysis on 335 patients with Glioblastoma and other forms of Gliomas. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 35. Available online: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-6511-6> (accessed on 15 November 2020). [CrossRef]
- Taylor, O.G.; Brzozowski, J.S.; Skelding, K.A. Glioblastoma multiforme: An overview of emerging therapeutic targets. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 963. Available online: <http://www.frontiersin.org> (accessed on 15 November 2020). [CrossRef] [PubMed]
- Silantsev, A.S.; Falzone, L.; Libra, M.; Gurina, O.I.; Kardashova, K.S.; Nikolouzakakis, T.K.; Nosyrev, A.E.; Sutton, C.W.; Mitsias, P.D.; Tsatsakis, A. Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells* **2019**, *8*, 863. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31405017/> (accessed on 15 November 2020). [CrossRef] [PubMed]
- Molinaro, A.M.; Taylor, J.W.; Wiencke, J.K.; Wrensch, M.R. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 405–417. Available online: <http://pmc/articles/PMC7286557/?report=abstract> (accessed on 13 December 2020). [CrossRef]
- Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27157931/> (accessed on 23 October 2020). [CrossRef]
- DeWitt, J.C.; Jordan, J.T.; Frosch, M.P.; Samore, W.R.; Iafrate, A.J.; Louis, D.N.; Lennerz, J.K. Cost-effectiveness of IDH testing in diffuse gliomas according to the 2016 WHO classification of tumors of the central nervous system recommendations. *Neuro Oncol.* **2017**, *19*, 1640–1650. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29016871> (accessed on 28 January 2019). [CrossRef]
- Sanai, N.; Berger, M.S. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery* **2008**, *62*, 753–764. [CrossRef]
- Sanai, N.; Polley, M.Y.; McDermott, M.W.; Parsa, A.T.; Berger, M.S. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J. Neurosurg.* **2011**, *115*, 3–8. [CrossRef]
- Ziu, M.; Kim, B.Y.S.; Jiang, W.; Ryken, T.; Olson, J.J. The role of radiation therapy in treatment of adults with newly diagnosed glioblastoma multiforme: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline update. *J. Neuro Oncol.* **2020**, *150*, 215–267. [CrossRef] [PubMed]
- Xu, Y.; Geng, R.; Yuan, F.; Sun, Q.; Liu, B.; Chen, Q. Identification of differentially expressed key genes between glioblastoma and low-grade glioma by bioinformatics analysis. *PeerJ* **2019**, *7*, e6560. Available online: <http://pmc/articles/PMC6409090/?report=abstract> (accessed on 10 December 2020).
- Li, L.; Liu, X.; Ma, X.; Deng, X.; Ji, T.; Hu, P.; Wan, R.; Qiu, H.; Cui, D.; Gao, L. Identification of key candidate genes and pathways in glioblastoma by integrated bioinformatical analysis. *Exp. Ther. Med.* **2019**, *18*, 3439–3449. Available online: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn> (accessed on 10 December 2020). [CrossRef]
- Galbraith, K.; Kumar, A.; Abdullah, K.G.; Walker, J.M.; Adams, S.H.; Prior, T.; Dimentberg, R.; Henderson, F.C.; Mirchia, K.; Sathe, A.A.; et al. Molecular Correlates of Long Survival in IDH-Wildtype Glioblastoma Cohorts. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2020**, *79*, 843–854. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32647886/> (accessed on 10 December 2020). [CrossRef] [PubMed]
- Dmitrenko, V.; Iershov, A.V.; Stetsyuk, P.I.; Lykhovid, A.P.; Laptin, Y.P.; Schwartz, D.R.; Mekler, A.A.; Kavsan, V.M. Determination of molecular glioblastoma subclasses on the basis of analysis of gene expression. *Cytol. Genet.* **2014**, *48*, 383–391. [CrossRef]

20. Brennan, C.; Momota, H.; Hambardzumyan, D.; Ozawa, T.; Tandon, A.; Pedraza, A.; Holland, E. Glioblastoma Subclasses Can Be Defined by Activity among Signal Transduction Pathways and Associated Genomic Alterations. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7752. Available online: <http://pmc/articles/PMC2771920/?report=abstract> (accessed on 22 November 2020). [CrossRef] [PubMed]
21. Phillips, H.S.; Kharbada, S.; Chen, R.; Forrest, W.F.; Soriano, R.H.; Wu, T.D.; Misra, A.; Nigro, J.M.; Colman, H.; Soroceanu, L.; et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 157–173. [CrossRef] [PubMed]
22. Liu, Y.-Q.; Wu, F.; Li, J.-J.; Li, Y.-F.; Liu, X.; Wang, Z.; Chai, R.-C. Gene Expression Profiling Stratifies IDH-Wildtype Glioblastoma with Distinct Prognoses. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1433. Available online: <http://pmc/articles/PMC6929203/?report=abstract> (accessed on 10 December 2020). [CrossRef] [PubMed]
23. Ma, S.; Rudra, S.; Campian, J.L.; Dahiya, S.; Dunn, G.P.; Johanns, T.; Goldstein, M.; Kim, A.H.; Huang, J. Prognostic impact of CDKN2A/B deletion, TERT mutation, and EGFR amplification on histological and molecular IDH-wildtype glioblastoma. *Neuro Oncol. Adv.* **2020**, *2*. Available online: <https://academic.oup.com/noa/article/doi/10.1093/noajnl/vdaa126/5908751> (accessed on 10 December 2020). [CrossRef]
24. Christians, A.; Adel-Horowski, A.; Banan, R.; Lehmann, U.; Bartels, S.; Behling, F.; Barrantes-Freer, A.; Stadelmann, C.; Rohde, V.; Stockhammer, F.; et al. The prognostic role of IDH mutations in homogeneously treated patients with anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Acta Neuropathol. Commun.* **2019**, *7*, 156. Available online: <http://pmc/articles/PMC6798425/?report=abstract> (accessed on 19 January 2021). [CrossRef] [PubMed]
25. Biau, J.; Chautard, E.; de Schlichting, E.; Dupic, G.; Pereira, B.; Fogli, A.; Müller-Barthélémy, M.; Dalloz, P.; Khalil, T.; Dillies, A.F.; et al. Radiotherapy plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma: A “real-life” report. *Radiat. Oncol.* **2017**, *12*, 197. Available online: <http://pmc/articles/PMC5719937/?report=abstract> (accessed on 19 January 2021). [CrossRef] [PubMed]
26. Incekar, F.; van der Voort, S.R.; Dubbink, H.J.; Atmodimedjo, P.N.; Nandoe Tewarie, R.; Lycklama, G.; Vincent, A.J.P.E.; Kros, J.M.; Klein, S.; van den Bent, M.; et al. Topographical Mapping of 436 Newly Diagnosed IDH Wildtype Glioblastoma With vs. Without MGMT Promoter Methylation. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 596. Available online: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00596/full> (accessed on 19 January 2021). [CrossRef] [PubMed]
27. Amelot, A.; de Cremoux, P.; Quillien, V.; Polivka, M.; Adle-Biasette, H.; Lehmann-Che, J.; Françoise, L.; Carpentier, A.F.; George, B.; Mandonnet, E.; et al. IDH-Mutation Is a Weak Predictor of Long-Term Survival in Glioblastoma Patients. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130596. Available online: <http://pmc/articles/PMC4497660/?report=abstract> (accessed on 19 January 2021). [CrossRef] [PubMed]
28. Sheikh, S.; Radivoyevitch, T.; Barnholtz-Sloan, J.S.; Vogelbaum, M. Long-term trends in glioblastoma survival: Implications for historical control groups in clinical trials. *Neuro Oncol. Pract.* **2020**, *7*, 158–163. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32626584/> (accessed on 1 January 2021). [CrossRef] [PubMed]
29. Stensjøen, A.L.; Solheim, O.; Kvistad, K.A.; Håberg, A.K.; Salvesen, Ø.; Berntsen, E.M. Growth dynamics of untreated glioblastomas in vivo. *Neuro Oncol.* **2015**, *17*, 1402–1411. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25758748/> (accessed on 10 December 2020). [CrossRef]
30. Pardee, A.B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **1989**, *246*, 603–608. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2683075/> (accessed on 24 November 2020). [CrossRef]
31. Zhang, D.; Dai, D.; Zhou, M.; Li, Z.; Wang, C.; Lu, Y.; Li, Y.; Wang, J. Inhibition of Cyclin D1 Expression in Human Glioblastoma Cells is Associated with Increased Temozolomide Chemosensitivity. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *51*, 2496–2508. Available online: <https://www.karger.com/Article/FullText/495920> (accessed on 24 November 2020). [CrossRef] [PubMed]
32. Laigle-Donadey, F.; Crinière, E.; Benouaich, A.; Lesueur, E.; Mokhtari, K.; Hoang-Xuan, K.; Sanson, M. Loss of 22q Chromosome is Related to Glioma Progression and Loss of 10q. *J. Neuro Oncol.* **2005**, *76*, 265–268. Available online: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11060-005-7019-2> (accessed on 24 November 2020). [CrossRef] [PubMed]
33. Nakamura, M.; Ishida, E.; Shimada, K.; Kishi, M.; Nakase, H.; Sakaki, T.; Konishi, N. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab. Invest.* **2004**, *85*, 165–175. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15592495/> (accessed on 24 November 2020). [CrossRef] [PubMed]
34. Oskam, N.T.; Bijleveld, E.H.; Hulsebos, T.J.M. A region of common deletion in 22q13.3 in human glioma associated with astrocytoma progression. *Int. J. Cancer* **2000**, *85*, 336–339. Available online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/%285IC1%291097-0215%2820000201%2985%3A3%3C336%3A%3AID-IJC7%3E3.0.CO%3B2-9> (accessed on 24 November 2020). [CrossRef]
35. Fisher, C. The diversity of soft tissue tumours with EWSR1 gene rearrangements: A review. *Histopathology* **2014**, *64*, 134–150. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24320889/> (accessed on 24 November 2020). [CrossRef]
36. Pandita, A.; Balasubramaniam, A.; Perrin, R.; Shannon, P.; Guha, A. Malignant and benign ganglioglioma: A pathological and molecular study. *Neuro Oncol.* **2007**, *9*, 124–134. Available online: <http://academic.oup.com/neuro-oncology/article/9/2/124/1116583/Malignant-and-benign-ganglioglioma-A-pathological> (accessed on 24 November 2020). [CrossRef] [PubMed]
37. Cimino, P.J.; McFerrin, L.; Wirsching, H.-G.; Arora, S.; Bolouri, H.; Rabadan, R.; Weller, M.; Holland, E.C. Copy number profiling across glioblastoma populations has implications for clinical trial design. *Neuro Oncol.* **2018**, *20*, 1368–1373. Available online: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/20/10/1368/5047422> (accessed on 10 December 2020). [CrossRef]

38. Geisenberger, C.; Mock, A.; Warta, R.; Rapp, C.; Schwager, C.; Korshunov, A.; Nied, A.-K.; Capper, D.; Brors, B.; Jungk, C.; et al. Molecular profiling of long-term survivors identifies a subgroup of glioblastoma characterized by chromosome 19/20 co-gain. *Acta Neuropathol.* **2015**, *130*, 419–434. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25931051/> (accessed on 10 December 2020). [CrossRef]
39. Mirchia, K.; Richardson, T.E. Beyond IDH-mutation: Emerging molecular diagnostic and prognostic features in adult diffuse gliomas. *Cancers* **2020**, *12*, 1817. Available online: <http://www.mdpi.com/journal/cancers> (accessed on 10 December 2020). [CrossRef]
40. Mansouri, A.; Hachem, L.D.; Mansouri, S.; Nassiri, F.; Laperriere, N.J.; Xia, D.; Lindeman, N.; Wen, P.Y.; Chakravarti, A.; Mehta, M.P.; et al. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: Refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol.* **2019**, *21*, 167–178. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30189035/> (accessed on 27 December 2020). [CrossRef]
41. Radke, J.; Koch, A.; Pritsch, F.; Schumann, E.; Misch, M.; Hempt, C.; Lenz, K.; Löbel, F.; Paschereit, F.; Heppner, F.L.; et al. Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients. *Acta Neuropathol. Commun.* **2019**, *7*, 89. Available online: <https://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-019-0745-z> (accessed on 27 December 2020). [CrossRef] [PubMed]
42. Marchi, F.; Sahnane, N.; Cerutti, R.; Cipriani, D.; Barizzi, J.; Stefanini, F.M.; Epistolio, S.; Cerati, M.; Balbi, S.; Mazzucchelli, L.; et al. The Impact of Surgery in IDH 1 Wild Type Glioblastoma in Relation with the MGMT Deregulation. *Front Oncol.* **2020**, *9*, 1569. Available online: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.01569/full> (accessed on 27 December 2020). [CrossRef] [PubMed]
43. Li, H.-X.; Peng, X.-X.; Zong, Q.; Zhang, K.; Wang, M.-X.; Liu, Y.; Han, G.-I. Cigarette smoking and risk of adult glioma: A meta-analysis of 24 observational studies involving more than 2.3 million individuals. *Onco Targets Ther.* **2016**, *9*, 3511–3523. Available online: <http://pmc/articles/PMC4913539/?report=abstract> (accessed on 22 November 2020). [PubMed]
44. Gittleman, H.; Cioffi, G.; Chunduru, P.; Molinaro, A.M.; Berger, M.S.; Sloan, A.; Barnholtz-Sloan, J.S. An independently validated nomogram for isocitrate dehydrogenase-wild-type glioblastoma patient survival. *Neuro Oncol. Adv.* **2019**, *1*. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31608326/> (accessed on 10 December 2020). [CrossRef] [PubMed]

Very late complications of oncotherapy in glioblastoma patients: A case series

Ondrej Kalita^a, Lumir Hrabalek^a, Matej Halaj^a, Pavel Hok^b, David Franc^b, Yvona Klementova^c, Martin Dolezel^c,
Eva Cechakova^c, Zuzana Sporikova^e, Jiri Drabek^e, Marian Hajduch^e, Lucie Tuckova^f

Background. Stroke-like syndrome is defined as a rare, delayed complication of brain oncotherapy. Cases with more favorable brain cancer diagnoses and longer life expectancy have been previously reported, but here we present, for the first time, three long-term survivors of glioblastoma with stroke-like syndromes.

Methods and Results. Three young or middle-aged patients underwent tumor resection and chemoradiotherapy. They received regular clinical and imaging follow-up with stable neurological status and no signs of tumor recurrence. They exhibited varied signs and symptoms (motor and sensory deficits, aphasia, memory and cognitive disorders, seizures, and headache) accompanied by imaging abnormalities. Stroke-like syndromes developed within 2-5 days and resolved in 2-6 weeks. Diffusion-weighted MRI and T2 brain perfusion abnormalities were demonstrated in all patients. In addition, there was focal T1 MRI contrast enhancement due to blood-brain barrier disruption. In addition to tumor recurrence, classic stroke, encephalitis, metabolic and mitochondrial disorders, and post-seizure swelling should be excluded. The imaging indicated intensive MRI scanning and symptomatic medication (steroids supplemented by antiepileptics, vasoactive agents, etc.) for judicious management. With respect to the course, an invasive procedure was still considered an option.

Conclusion. All stroke-like syndromes are diagnoses of exclusion. To avoid misinterpretation of imaging findings as glioblastoma recurrence and avert recall oncotherapy or redundant interventions, better understanding of delayed complications of brain tumor therapy is crucial.

Key words: stroke-like syndrome, glioblastoma, oncotherapy, corticosteroid

Received: November 28, 2020; Revised: January 14, 2021; Accepted: January 29, 2021; Available online: February 22, 2021
<https://doi.org/10.5507/bp.2021.012>

© 2021 The Authors; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

^aDepartment of Neurosurgery, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

^bDepartment of Neurology Radiology, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

^cDepartment of Oncology, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

^dDepartment of Radiology, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

^eLaboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

^fDepartment of Pathology and Laboratory of Molecular Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

Corresponding author: Ondrej Kalita; e-mail: ondrej.kalita@fnol.cz

BACKGROUND

Despite advanced imaging, surgical, and oncological techniques, the prognosis of patients with glioblastoma (GBM) remains dismal. However, some signs of improvement in treatment outcomes of patients with GBM can be traced over the last decades¹.

The best outcomes are yielded by aggressive multimodal therapy involving safe and maximal resection followed by chemoradiotherapy¹. However, side effects of this aggressive treatment seriously impact not only GBM patients' quality of life, but also their overall survival. The ensuing follow-up involves MRI and clinical status review, assessment of tumor recurrence or residuum, and distinguishing between true progression, pseudoresponse, and pseudoprogression. Temporary and permanent surgical complications are obvious immediately after resection and

within several months, respectively. By contrast, side effects of oncological treatment commonly have a gradual presentation, some occurring after months or even years. In particular, very late complications are the most difficult to identify. Several diagnostic items have been defined.

"SMART" - stroke-like migraine attacks after radiotherapy is an uncommon, very late complication of cranial radiotherapy. It typically presents as reversible, unilateral cortical signs on MRI and symptoms such as confusion, hemiparesis, seizures, and headaches².

"PIPG" - peri-ictal pseudoprogression refers to transient seizure-related MRI changes that could mimic disease progression³.

"ALERT" - a syndrome characterized by acute late-onset encephalopathy after radiotherapy⁴.

CASE 1 – SMART

In 2010, a 37-year-old woman presented with a two-week history of fluctuating left-sided hemiparesis and sensory symptoms. Brain MRI revealed a contrast-enhanced tumor in the parasagittal region of the right parietal lobe. She received radical resection in January 2010, followed by chemoradiotherapy (Stupp regime). Histological diagnosis confirmed GBM, immunohistochemistry detected IDH1 canonical R132H mutation, and PCR revealed MGMT promoter methylation and IDH1 canonical R132H mutation, retrospectively⁵. She was followed by regular clinical and imaging check-ups, with stable neurological status and no signs of tumor recurrence. Despite her left hemiparesis, she had independent gait, and permanently looked after her blind husband. In January 2019, a follow-up MRI disclosed a new, contrast-enhanced lesion in the periventricular region of her right temporal lobe, relatively far from the original resection cavity (Fig. 1a,b). In February 2019, a PET FLT scan showed no radiotracer uptake in brain tissue (Fig. 1c). Surprisingly, another follow-up MRI showed effacement of the contrast-enhanced lesion in March 2019 (Fig. 1d). In May 2019, there was disability progression, with worsening of hemiparesis, accompanied by development of anxiety and depressed mood, migraine and mild epileptic seizures. A new MRI, in June 2019, revealed new multiloculated contrast-enhanced lesions around the original resection cavity in the right parietal lobe and a blurred contrast-enhanced region in the right temporal lobe (Fig. 1d). EEG showed a nonspecific abnormal pattern consistent with a lesion, with no signs of epileptic activity. The patient received antiepileptics, corticoids, and anxiolytics, rehabilitation services and psychiatric interventions. Another follow-up MRI, in September 2019, again showed lesion disappearance. Based on an incidental MRI finding, complementary CT angiography confirmed a radiation-related basilar tip aneurysm, which was managed with endovascular coil embolization (October 2019) (Fig. 1e,f). The next follow-up MRI (September 2020) detected no enhanced lesion (Fig. 1g,h). There was an incomplete recovery. The patient was free from migraine, anxiety, and epileptic seizures, but continued to use a wheelchair due to severe left hemiparesis.

CASE 2 – SMART/PIPG

In 2009, a 16-year-old male patient presented with a short history of right-sided hemiparesis. Brain MRI revealed a contrast-enhanced tumor in the left TP cerebral region. He underwent radical resection, followed by chemoradiotherapy (Stupp regime). The histological diagnosis was GBM, and retrospective immunohistochemical analysis detected IDH1 mutation. He was followed by regular clinical and imaging check-ups with no signs of tumor recurrence or neurological deterioration. He was fully independent, with no epileptic seizures, and no motor or sensory deficits. He graduated from the Faculty of Law of a local university in June 2018. In December 2018 he suffered from sudden

onset of right-sided hemiparesis, hemihypesthesia, and speech disorder. Emergency MRI showed a hyposignal and hypersignal lesion in the frontal periphery of the resection cavity, visible in T1 and FLAIR scans, respectively (Fig. 2a,b), suggestive of acute ischemia. Accordingly, MR angiography revealed acute ischemia in the MCA region. PET FLT, echocardiography, Holter ECG, and extracranial vessel ultrasonography yielded no tumor recurrence or cardiovascular emboligenic perturbation. After conservative treatment (anticoagulant and antiplatelet therapy, anxiolytics) for a month, he recovered uneventfully. MRI revealed no tumor recurrence in May 2020.

CASE 3 – PIPG/ALERT

In 2012, a 39-year-old man presented with his first epileptic seizures. Brain MRI revealed a contrast-enhanced tumor in the parasagittal region of the right parietal lobe. He underwent radical resection, followed by chemoradiotherapy (Stupp regime). The histological diagnosis was GBM. Retrospective immunohistochemical analysis detected canonical R132H mutation of IDH1, and PCR revealed MGMT promoter methylation and canonical R132H mutation of IDH1 (ref.⁵). He was followed by regular clinical and imaging check-ups with no signs of tumor recurrence or neurological deterioration. Despite only partial epileptic control (with a few remaining mild episodes per month), he was independent, with no mobility impairment. In January 2018, disclosure by a follow-up MRI of a new, blurred, small contrast-enhanced lesion in the resection cavity wall and the adjacent cortex was followed by a rise in convulsive activity (Fig. 3a,b). A PET FLT scan showed no radiotracer uptake in brain tissue. His clinical status stabilized following modification of antiepileptic therapy and corticoid administration. The patient recovered completely. MRI indicated no tumor recurrence in June 2020 (Fig. 3c).

DISCUSSION

All our patients shared common features, including a radically resected, IDH-mutated, and MGMT-methylated GBM, a history of chemoradiotherapy, young to middle age tumor presentation, and long survival. For a long period in the regular follow-up, they were in relatively good health and showed no evidence of tumor recurrence. Both patients 1 and 3 had a stable, radiation-induced leukoencephalopathy. The onset of neurological deterioration was characterized by ambiguous dynamics. The new, transient, diffuse, cortical postcontrast abnormalities on MRI in Patients 1 and 3 preceded episodes of headaches, drowsiness, confusion/hallucinations, stroke-like symptoms, and complex seizures for several months. By contrast, Patient 2 suffered from post-stroke neurological impairment without prodromal MRI abnormalities. Due to the clinical severity of their status, Patients 1 and 2 required hospital admission. Initial MRI changes mimicked some aspects of GBM progression, with edema and gadolinium-

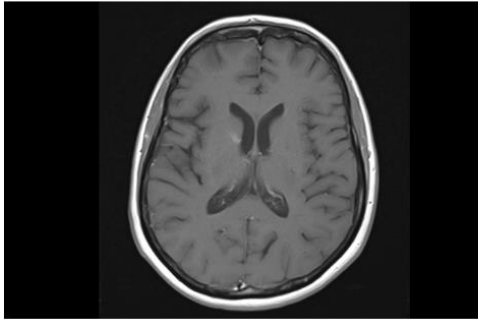


Fig. 1a. Axial T1-weighted MRI scan, showing contrast-enhanced lesion in the periventricular region of the right temporal lobe.

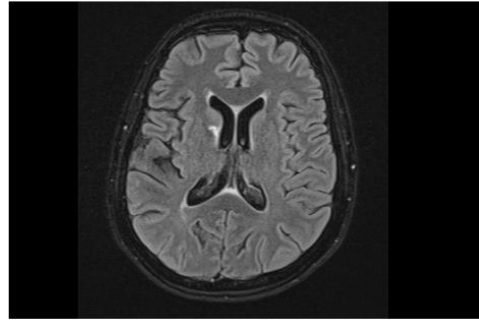


Fig. 1b. Diffusion-weighted MRI showing local hyperintensity.

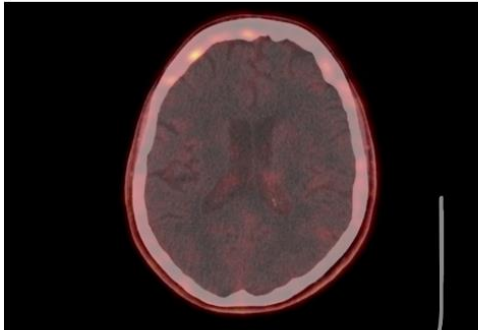


Fig. 1c. PET FLT scan showing no radiotracer uptake in brain tissue.

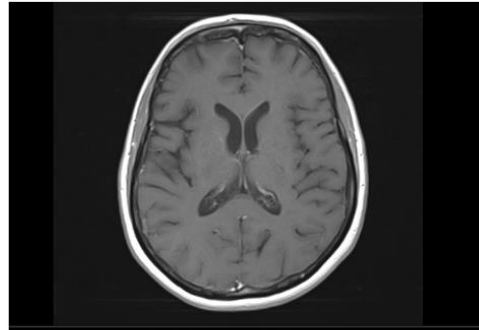


Fig. 1d. Axial T1-weighted MRI scan showing effacement of the contrast-enhanced lesion in the right periventricular region.

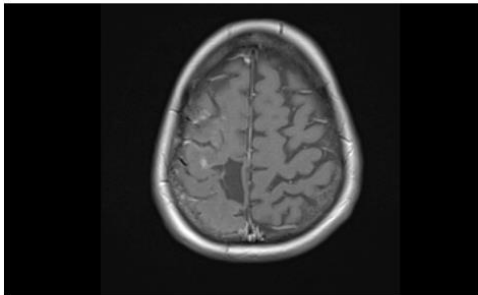


Fig. 1e. Axial T1-weighted MRI scan showing multiloculated contrast-enhanced lesions around the original resection cavity in the right parietal lobe and a blurred contrast-enhanced region in the right temporal lobe.

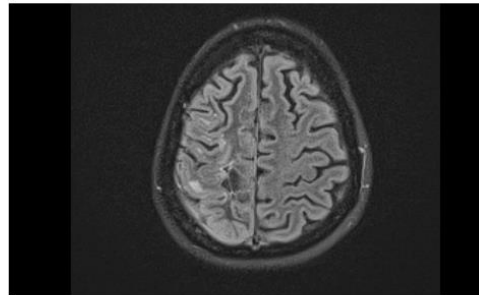


Fig. 1f. Diffusion-weighted MRI scan showing multilocal hyperintensity.

enhancing foci, including the cortex. However, although standard T1 postcontrast, diffusion imaging and PET FLT scans showed uncommon or elusive GBM features, the MRI abnormalities were limited in brain tissues near or not far from the resection cavity. Results of CSF analysis (cell count, protein transfer, total proteins, glucose,

PCR-based examination of CSF for viral infection) were unremarkable for all patients. EEG recordings during the acute phase showed diffuse slow abnormalities in all patients. To avoid burdensome diagnostic and therapeutic procedures, an intensive wait-and-scan strategy was adopted. There is no causal treatment, so symptomatic



Fig. 1g. CT angiograph confirming a radiation-related basilar tip aneurysm that was managed with endovascular coil embolization (1h).

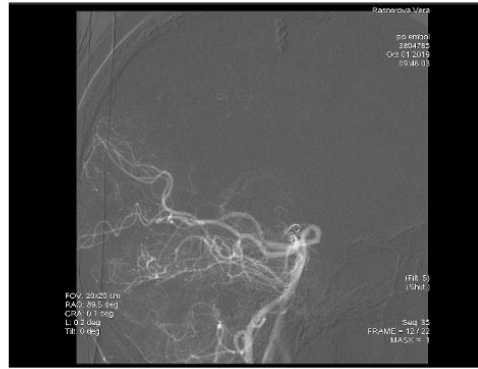


Fig. 1h. Endovascular coil embolization.

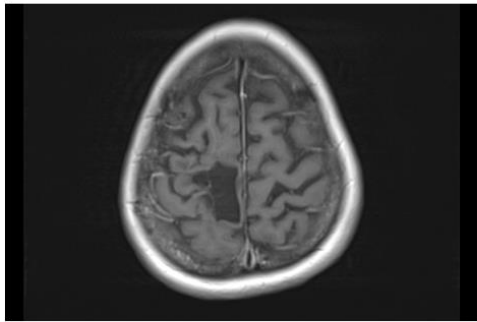


Fig. 1i. Axial T1-weighted MRI scan showing disappearance of the multiloculated contrast-enhanced lesions.

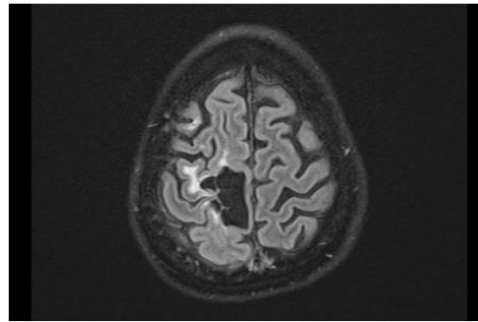


Fig. 1j. Axial diffusion-weighted MRI scan showing reduction in multilocal hyperintensity.

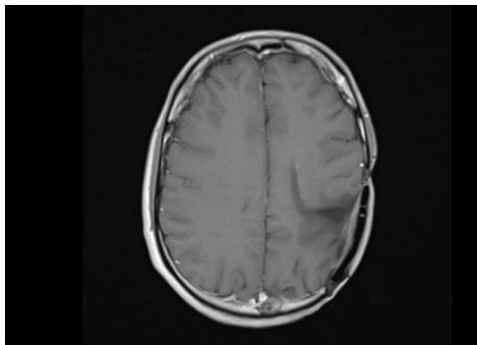


Fig. 2a. Axial T1-weighted MRI scan showing no contrast-enhanced lesion.

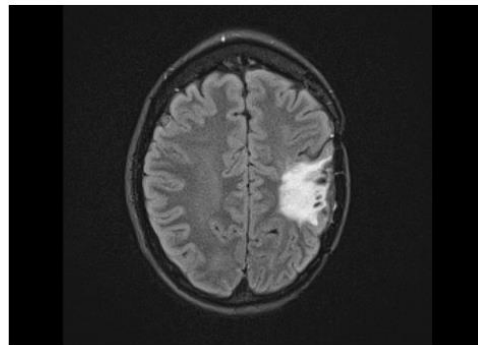


Fig. 2b. Diffusion-weighted MRI scan showing hypersignal zone in the frontal periphery of the resection cavity.

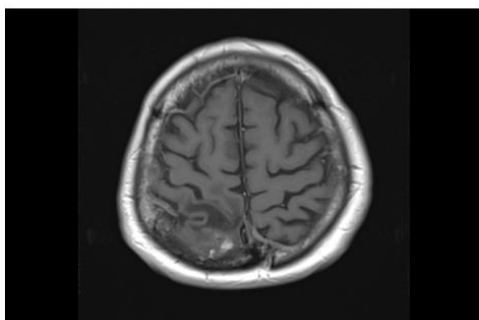


Fig. 3a. Axial T1-weighted MRI scan showing contrast-enhanced lesion around the original resection cavity in the right parietal lobe.

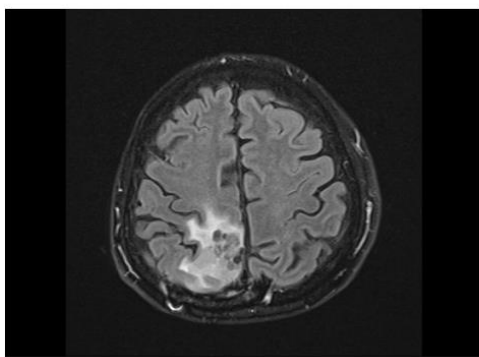


Fig. 3b. Diffusion-weighted MRI scan showing multilocal hypersignal rim encompassing the resection cavity shown in 3a.

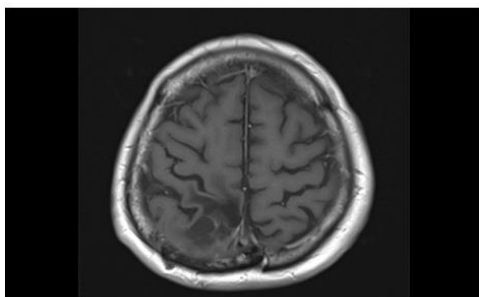


Fig. 3c. Axial T1-weighted MRI scan showing disappearance of the multilobulated contrast-enhanced lesions.

therapy was administered including high-dose corticosteroids and antiepileptics. However, given their uncertain efficacy, antiplatelet (acetylsalicylic acid, clopidogrel) and vasodilatory (calcium channel blockers – propranolol, nimodipine; β -adrenoceptor blockers – verapamil) agents were added.

Based on a careful clinical status assessment, the initial high-dose corticotherapy administered to our patients (16–24 mg of dexamethasone per day) was gradually tapered. At the time of writing, patients 1 and 2 receive no corticotherapy, and patient 3 remains on a low maintenance dose of 2 mg dexamethasone per day. All patients were initially administered antiplatelet therapy (acetylsalicylic acid: 100–200 mg per day), and patients 1 and 2 continue to receive it. Patient 1 was originally seizure-free on carbamazepine, but after a stroke-like attack, lacosamide was added. At the patient's request, lacosamide was withdrawn after stabilization of his clinical status. New antiepileptics (clonazepam, levetiracetam) were added to patient 3's chronic medication of valproic acid. As anxiolytic therapy, citalopram was administered in combination with bromazepam and alprazolam to Patients 1 and 2, respectively.

Patients 2 and 3 recovered completely. A SMART episode led to permanent worsening of neurological deficits in Patient 1, and a further complication was the radiation-related basilar tip aneurysm, which was treated with endovascular coil embolization.

CONCLUSION

Stroke-like syndrome is a rare, delayed complication of brain oncotherapy. More than 100 cases have been published globally, but only cases with more favorable brain cancer diagnoses with a longer life expectancy have been reported^{3,6}. For the first time, our case series presents three long-term survivors of GBM with stroke-like syndrome. A 5-year survival rate of 17% for GBM patients under 50 years old was recorded in a randomized phase III study⁷, but only a 5-year overall relative survival rate of 6.8% in real clinical practice⁸. Originally, all our patients underwent tumor resection and chemoradiotherapy. All of them had acute MRI alterations, but two had imaging abnormalities before clinical manifestation. They presented with varied signs and symptoms (focal deficits, encephalopathy, seizures, and headache) (ref.^{3,9}). Stroke-like syndromes developed within 2–5 days but resolved in 2–6 weeks. Diffusion-weighted MR and T2 brain perfusion abnormalities were detected in all patients, with focal MRI contrast enhancement due to blood-brain barrier disruption. Only Patient 1 had obscure thick gyriform cortical enhancement characteristic of SMART. Besides tumor recurrence, classic stroke, encephalitis, metabolic and mitochondrial disorders, and post-seizure swelling should be excluded⁹. The imaging indicated intensive MRI scanning and symptomatic medication (steroids, for their inflammatory and anti-edemic effects, supplemented by antiepileptics, vasoactive agents, etc.) for judicious

management. It must be kept in mind that no imaging technique has 100% specificity and sensitivity, and both surgery and oncotherapy affect EEG and MRI results. Regarding the course, invasive procedures such as biopsy and tumor re-resection were still considered options.

The pathophysiology of stroke-like syndrome remains unclear, but a set of plausible causes has already been accepted. Compromised brain perfusion has been acknowledged in the literature as a process underlying syndrome progression¹⁰. Cranial irradiation alters neurogenesis, neuron morphology, and mitochondrial disorders, as well as causing endothelial damage, mainly to small vessels. In the following period, vascular dysfunction results in hypoxia of brain cells with impaired autoregulatory parameters and activates cerebral hyperexcitability. Conversely, seizure activity affects the previously injured brain microenvironment and potentiates inflammatory endothelial damage.

All stroke-like syndromes are diagnoses of exclusion. To avoid misinterpretation of imaging findings as GBM recurrence, and avert recall oncotherapy or redundant interventions, better understanding of delayed complications of brain tumor therapy is crucial. An antecedent event for the sudden onset of brain tissue destruction has not been elucidated. Close cooperation of neuro-oncology team members is essential, but neurological recovery is not always completed, and the recovery range of stroke-like syndromes still remains unpredictable. To date, no knowledge of the possible parallel effects of surgery and systemic chemotherapy (temozolomide) on these syndromes' development has been acquired. Brain tissue reaction to cranial irradiation evolves in an individual pattern and without predictive markers. As no effective GBM treatment that spares normal brain tissue has been identified to date, cranial irradiation will continue to be the standard part of GBM treatment, and we will continue to encounter sequelae (such as stroke-like syndrome) for the foreseeable future. Hence, there are clear needs to characterize the sequelae, and identify ways to minimize both their frequency and severity.

ABBREVIATIONS

ALERT, Acute late-onset encephalopathy after radiotherapy; CNS, Central nervous system; CSF, Cerebrospinal fluid; FLT, 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine; GBM, Glioblastoma; IDH, Isocitrate dehydrogenase; MGMT, Methyl O6-methylguanine-DNA-methyltransferase; PET, Positron emission tomography; PCR, Polymerase chain reaction; PIPG, Peri-ictal pseudoprogression; SMART, Stroke-like migraine attacks after radiotherapy.

Authors contributions: OK: patient management, literature review, analysis of the radiologic data, initial draft manuscript preparation, concept and design of the study, analysis of the radiologic data, final approval of the version to be published; LH: conception and design of the study, final approval of the submitted version; MH, PK, DF, YK, MD: literature review, patient management; EC: analysis

of the radiological data; ZS: literature review, evaluation and provision laboratory data, final approval of the submitted version of the manuscript; JD, MH, LT: literature review, initial draft manuscript preparation, evaluation and provision of laboratory and pathological data; OK, ZS: contributed equally to the work; All authors have read and approved manuscript.

Conflict of interest statement: The authors state that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

REFERENCES

1. Sheikh S, Radivoyevitch T, Barnholtz-Sloan JS, Vogelbaum M. Long-term trends in glioblastoma survival: implications for historical control groups in clinical trials. *Neurooncol Pract* 2020;7(2):158-63.
2. Lim SY, Brooke J, Dineen R, O'Donoghue M. Stroke-like migraine attack after cranial radiation therapy: the SMART syndrome. *Pract Neurol* 2016;16(5):406-8.
3. Di Stefano AL, Berzero G, Ducray F, Eoli M, Pichiecchio A, Farina LM, Cuccarini V, Brunelli MC, Diamanti L, Condetto Auliac S, Salmaggi A, Silvani A, Giometto B, Pace A, Vidiri A, Bourdain F, Bastianello S, Ceroni M, Marchioni E. Stroke-like events after brain radiotherapy: a large series with long-term follow-up. *Eur J Neurol* 2019;26(4):639-50.
4. Di Stefano AL, Berzero G, Vitali P, Galimberti CA, Ducray F, Ceroni M, Bastianello S, Colombo AA, Simoncelli A, Brunelli MC, Giometto B, Diamanti L, Gaviani P, Salmaggi A, Silvani A, Marchioni E. Acute late-onset encephalopathy after radiotherapy: an unusual life-threatening complication. *Neurology* 2013;81:1014-7.
5. Urbanovska I, Houdova Megova M, Kalita O, Uvirova M, Simova J, Tuckova L, Buzrla P, Palecek T, Hajdich M, Dvorackova J, Drabek J. IDH1 mutation analysis by CADMA compared with SNaPshot assay and two immunohistochemical methods. *Pathol Oncol Res* 2019;25(3):971-78.
6. Biju RK, Dower A, Moon BG, Gan P. SMART (Stroke-Like Migraine Attacks After Radiation Therapy) syndrome: A case study with imaging supporting the theory of vascular dysfunction. *Am J Case Rep* 2020;28:21:e921795.
7. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009;10:459-66.
8. Wen PY, Weller M, Lee EQ, Alexander BM, Barnholtz-Sloan JS, Barthel FP, Batchelor TT, Bindra RS, Chang SM, Chiocca EA, Cloughesy TF, DeGroot JF, Galanis E, Gilbert MR, Hegi ME, Horbinski C, Huang RY, Lassman AB, Le Rhun E, Lim M, Mehta MP, Mellinghoff IK, Minniti G, Nathanson D, Platten M, Preusser M, Roth P, Sanson M, Schiff D, Short SC, Taphoorn MJB, Tonn JC, Tsang J, Verhaak RGW, von Deimling A, Wick W, Zadeh G, Reardon DA, Aldape KD, van den Bent MJ. Glioblastoma in adults: A Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro Oncol* 2020;22(8):1073-113.
9. Black DF, Morris JM, Lindell EP, Krecke KN, Worrell GA, Bartleson JD, Lachance DH. Stroke-like migraine attacks after radiation therapy (SMART) syndrome is not always completely reversible: a case series. *Am J Neuroradiol* 2013;34(12):2298-303.
10. Wilke C, Grosshans D, Duman J, Brown P, Li J. Radiation-induced cognitive toxicity: pathophysiology and interventions to reduce toxicity in adults. *Neuro Oncol* 2018;20(5):597-607.



Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer

Zuzana Sporikova, Vladimira Koudelakova, Radek Trojanec, Marian Hajduch

Abstract

Triple-negative breast cancer (TNBC) accounts for 15% to 20% of breast cancer cases and is characterized by the absence of estrogen, progesterone, and human epidermal growth factor 2 receptors. Though TNBC is a highly heterogenic and aggressive disease, TNBC patients have better response to neoadjuvant therapy compared to other breast cancer subtypes. Nevertheless, patients with residual disease have a very poor prognosis, with higher probability of relapse and lower overall survival in the first years after diagnosis. TNBC has 6 subtypes with distinct molecular signatures with different prognoses and probably different responses to therapy. The precise stratification of TNBC is therefore crucial for the development of potent standardized and targeted therapies. In spite of intensive research into finding new molecular biomarkers and designing personalized therapeutic approaches, *BRCA* mutational status is the only clinically validated biomarker for personalized therapy in TNBC. Recent studies have reported several promising biomarkers that are currently being validated through clinical trials. The objective of this review was to summarize the clinically relevant genetic markers for TNBC that could serve as diagnostic, prognostic, or predictive or could improve personalized therapeutic strategies.

Clinical Breast Cancer, Vol. 18, No. 5, e841-50 © 2018 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords: *BRCA*, p53, Predictor, Prognosis, Targeted therapy

Introduction

Breast cancer is the leading cause of cancer death in women worldwide, and triple-negative breast cancer (TNBC) accounts for approximately 15% to 20% of all new cases. All TNBC subtypes share a common gene expression pattern: the absence of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2; also known as ERBB2) expression.^{1,2} Despite these shared features, TNBC is a highly heterogeneous disease that can be divided into many distinct subgroups according to clinical, histopathologic, and molecular profiles.³ TNBC patients are typically young (< 40 years), are African American, and have shorter progression-free survival and overall survival (OS) relative to non-TNBC breast cancer patients.⁴⁻⁸ The disease also follows a more aggressive course, characterized by higher relapse rates and worse prognosis, than hormone receptor-positive tumors.^{4,5} The insidiousness of TNBC lies in the high prevalence of highly proliferating grade 3 tumors at diagnosis.⁹ Additional features of TNBC include a peak in recurrence between 1 and 3 years after

diagnosis (hazard ratio = 2.6; $P < .0001$), as well as a majority of deaths occurring within 5 years of therapy (hazard ratio = 3.2; $P < .0001$) compared to non-TNBC phenotypes.⁷ TNBC patients usually experience better pathologic complete response rates (pCR) after neoadjuvant chemotherapy (pCR rates in 30%-40%). Moreover, TNBC patients who experience pCR have excellent long-term clinical outcome. However, TNBC patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy have very poor prognosis.¹ The recurrence of TNBC is associated with a high risk of metastasis to the lungs or central nervous system, a lower risk of bone metastasis, and a dismal median survival of approximately 1 year.^{7,10-12}

The intricacy of this disease is further illustrated by the high prevalence of rare histopathologic subtypes such as metaplastic (90%), medullary (95%), and apocrine (40%-60%) carcinomas.¹³ When both the poor prognosis facing TNBC patients and the lack of a recognized predictor of therapy response are considered, the need to identify specific markers that can be targeted by tailored therapies or used to predict response to chemotherapy is indisputable.

This review focuses on genetic alterations in TNBC that could serve as predictive markers of prognosis, which will help in selecting a suitable chemotherapy approach and/or inspire further research.

Intrinsic Subgroups of Breast Cancer

Breast cancer comprises a heterogeneous group of diseases that can be, according to gene expression profiles, classified into luminal

Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital in Olomouc, Olomouc, Czech Republic

Submitted: Feb 16, 2018; Revised: Jun 22, 2018; Accepted: Jul 27, 2018; Epub: Aug 4, 2018

Address for correspondence: Vladimira Koudelakova, PhD, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital in Olomouc, Hnevotinska 5, 775 15 Olomouc, Czech Republic
E-mail contact: vladimira.koudelakova@upol.cz

Genetic Markers in TNBC

A, luminal B, basal-like, normal-like and HER2-enriched subgroups.^{14,15} The PAM50 assay, a 50-gene subtype predictor, was developed on the basis of these expression profiles.¹⁶ These so-called intrinsic subgroups of breast cancer show differences in incidence, age at diagnosis, prognosis, and response to treatment.^{15,17}

At the morphologic level, TNBC and basal-like breast cancer (BLBC) are similar in terms of larger tumor size, higher grade, presence of geographic necrosis, enhanced invasive potential, and stromal lymphocytic infiltration.^{7,12,18,19} However, the gene expression profiles of only 71% of TNBC samples are clustered as basal-like. Moreover, only 77% of the basal-like tumors bear TNBC signatures.²⁰ This observation was confirmed through the molecular characterization of 412 TNBC and 473 basal-like (based on PAM50 subtype prediction) breast cancer samples.²¹ Using this approach, 21.4% of TNBC samples were not assigned as BLBC, and 31.5% of BLBC samples did not display a TNBC profile. Out of 412 TNBC samples, 78.6% were identified as BLBC, 7% as normal-like, 7.8% as HER2 enriched, 4.4% as luminal B, and 2.2% as luminal A.

TNBC Subtypes

Once the molecular heterogeneity of TNBC was recognized, subsequent research focused on classifying TNBC subtypes on the basis of disease prognosis or the expected response to systemic therapy. Groundbreaking work identified 6 different TNBC gene expression profile subtypes from 587 TNBC cases identified in 21 gene expression data sets using a top-down approach of hierarchical clustering.²² The subtypes were named according to their expression patterns: basal-like 1 and 2 (BL1/2), immunomodulatory (IM), mesenchymal (M), mesenchymal stem-like (MSL), and luminal androgen receptor (LAR) (Table 1). Following this classification, approximately 30 TNBC cell lines have been identified as models of the distinct subtypes and are used to investigate which pharmacologic strategies are most effective against each subtype.

Both BL1 and BL2 subtypes are sensitive to DNA-damaging agents (such as cisplatin) and show elevated expression of cell-cycle and DNA damage-response genes. While BL1 is characterized

by heightened expression of both cell division and DNA damage-response genes, as well as elevated Ki-67 expression, BL2 displays up-regulated growth factor signaling, glycolysis, and gluconeogenesis along with increased expression of myoepithelial markers.²²

Both M and MSL subtypes are characterized by decreased distant metastasis-free survival and positive response to phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibitors and dasatinib. The gene expression profiles of the M and MSL subtypes overlap with that of chemoresistant metaplastic breast cancer and display the up-regulation of genes involved in epithelial–mesenchymal transition, cell motility, extracellular matrix remodeling, and cellular differentiation. Unlike the M subtype, which displays overexpression of proliferation genes, the MSL subtype is enriched in mesenchymal stem-cell–associated genes and shows up-regulation of genes involved in angiogenesis and growth factor pathways. The MSL subtype overlaps with the previously described claudin-low subtype, as both demonstrate reduced claudin 3, 4, and 7 expression.^{22,24}

The IM subtype is characterized by increased expression of immune signaling genes (immune cell and cytokine signaling, antigen processing and presentation, core immune signaling pathways). The IM expression profile overlaps with the molecular signature of medullary breast cancer, and both classifications share a good prognosis.^{2,25} Expression profile of IM subtype is generated by tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) rather than tumor cells itself.²⁶ The robust presence of TILs has been found in approximately 20% of TNBC and was found to be an independent prognostic marker in TNBC. The BIG 02-98, ECOG 2197, and ECOG 1199 trials demonstrated very similar results, with 15% to 20% reduction in any recurrence and mortality for every 10% increase in stromal TILs.²⁷⁻²⁹ The presence of TILs is associated with better response to both adjuvant and neoadjuvant therapy, and could serve as marker of better outcome when detected in residual tumor after neoadjuvant therapy.²⁷⁻³⁰⁻³²

The final subtype, LAR, is enriched in genes involved in hormone signaling, steroid synthesis, and androgen/estrogen metabolism, including overexpression of androgen receptor (AR) and its

Table 1 Triple-Negative Breast Cancer Subtype Characterization²²

Subtype	Signaling Pathways	Important Markers	Chemosensitivity ²³	Potential Therapy
BL1	Cell cycle, proliferation, DNA damage pathways	<i>ATR, BRCA, MYC, NRAS, Ki-67</i>	Very good	Cisplatin, PARP inhibitors
BL2	Cell cycle, proliferation, growth factor signaling, glycolysis, gluconeogenesis	<i>EGFR, MET, EPHA2, TP53</i>	Very poor	Cisplatin; PARP and growth factor inhibitors
IM	Immune cell signaling processes	<i>JAK1/2, STAT1/4, IRF1/7/8, TNF</i>	Medium	—
M	EMT, cell motility, differentiation, proliferation	<i>Wnt, ALK, TGF-β</i>	Medium	PI3K/mTOR, Src inhibitors
MSL	EMT, cell motility, differentiation, growth factor signaling, angiogenesis	<i>EGFR, PDGFR, ERK1/2, VEGFR2</i>	Medium	PI3K/mTOR, Src inhibitors
LAR	Androgen/estrogen metabolism, steroid synthesis, porphyrin metabolism	<i>AR, FOXA1, KRT18, XBP1</i>	Poor	AR antagonist; PI3K, Hsp90 inhibitors

Abbreviations: *ALK* = anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase; *AR* = androgen receptor; *ATR* = ataxia telangiectasia and Rad3 related; *BL1* = basal-like 1; *BL2* = basal-like 2; *BRCA* = breast cancer gene; *EGFR* = epidermal growth factor receptor; EMT = epithelial–mesenchymal transition; *EPHA2* = ephrin type A receptor 2; *ERK1/2* = mitogen-activated protein kinase 1/2; *FOXA1* = forkhead box A1; Hsp90 = heat shock protein 90; IM = immunomodulatory; *IRF1/7/8* = interferon regulatory factor 1; *JAK1/2* = Janus kinase 1/2; *Ki-67* = marker of proliferation Ki-67; *KRT18* = keratin 18; LAR = luminal androgen receptor; M = mesenchymal; *MET* = hepatocyte growth factor receptor; MSL = mesenchymal stem-like; *mTOR* = mechanistic target of rapamycin; *MYC* = MYC proto-oncogene; *NRAS* = neuroblastoma Ras; PARP = poly(ADP-ribose) polymerase; *PDGFR* = platelet-derived growth factor receptor; PI3K = phosphoinositide 3-kinase; *Src* = SRC proto-oncogene; *STAT1/4* = signal transducer and activator of transcription 1/4; *TGF- β* = transforming growth factor β ; *TNF* = tumor necrosis factor; *TP53* = tumor protein P53; *VEGFR2* = vascular endothelial growth factor receptor 2; *Wnt* = Wnt family member; *XBP1* = X-box binding protein 1.

downstream targets and coactivators. Patients with the LAR subtype show shorter relapse-free survival. This subtype overlaps with the previously described molecular apocrine group.³³ One possible therapy regimen for this subtype targets the AR antagonist (ie, flutamide, enzalutamide, bicalutamide).³⁴ Moreover, LAR-subtype cell lines are sensitive to PI3K inhibitors as a result of a mutation in the phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α (PIK3CA) kinase domain.²

A study clarifying the clinical relevance of the 7-subtype classification of TNBC revealed differences in pCR after neoadjuvant chemotherapy ($P = .044$) and found the TNBC subtype to be an independent predictor of pCR status ($P = .022$) by a likelihood

ratio test. BL1 showed the highest pCR rate (52%), while BL2 and LAR subtypes showed the lowest rates (0% and 10%, respectively).²³

Genetic Markers in TNBC

The molecular and genetic profiles of TNBC, known for its enormous complexity and diversity, continue to challenge researchers all around the world. As mentioned above, TNBC tumors are characterized by the lack of ER, PR, and HER2 expression. The lack of therapeutic targets complicates efforts to characterize TNBC with certain molecular markers in a bid to improve disease outcome. To date, two large studies have focused

Gene	Localization	Alteration Type	Main Function	Prognostic Significance	Predictive Significance	References
<i>TP53</i>	17p13.1	Inactivating mutation	Genome integrity, DNA repair and apoptosis	Poor prognostic factor, worse OS and increased metastatic risk	Poor response to chemotherapy	37-43
<i>BRC1</i>	17q21.31	Inactivating mutation, epigenetic changes	DNA double-strand break repair	Poor prognostic factor	Higher response to neoadjuvant anthracycline and taxane therapy, response to platinum-based therapy, potential predictor for response to PARP inhibitors	23,44-50
<i>BRC2</i>	13q13.1					
<i>PIK3CA</i>	3q26.32	Activating mutation	Survival, differentiation, proliferation	Poor prognostic factors	Potential predictors for response to PI3K/AKT/mTOR inhibitors	51-53
<i>PTEN</i>	10q23.31	Deletion, inactivating mutation			Higher sensitivity to combination therapy of PI3K and androgen receptor inhibitors	54,55
<i>INPP4B</i>	4q31.21	Deletion				
<i>EGFR</i>	7p11.2	Amplification, overexpression	Cell proliferation, metastasis	Poor prognostic factor	Potential predictor for response to anti-EGFR therapy	56-58
<i>FGFR1</i>	8p11.23	Amplification	Proliferation, survival, migration, differentiation	Unknown	In vitro sensitivity to FGFR ATP-competitive inhibitor brigandib	59-62
<i>FGFR2</i>	10q26.13				In vitro sensitivity to FGFR ATP-competitive inhibitor PD173074	59,63
<i>VEGFA</i>	6p21.1	Overexpression, amplification, mutation	Angiogenesis, invasion, metastases	Unknown	Addition of bevacizumab to chemotherapy significantly elevates pCR rates	28,48,64-67
<i>VEGFB</i>	11q13.1					
<i>VEGFC</i>	4q34.3					
<i>AR</i>	Xq12	Overexpression	Cell signaling	Controversial; probably better DFS and OS	Lower sensitivity to chemotherapy, higher sensitivity to AR inhibitors (enzalutamide, bicalutamide), PI3K inhibitors, and their combination	23,68-72
<i>BCL2</i>	18q21.33	Overexpression	Antiapoptotic	Positive prognostic factor	Negative predictor of response to neoadjuvant and adjuvant anthracycline-based chemotherapy, positive predictor of response to CMF treatment	73-76

Abbreviations: *TP53* = tumor protein P53; *PTEN* = phosphatase and tensin homolog; *INPP4B* = inositol polyphosphate-4-phosphatase type II B; *EGFR* = epidermal growth factor receptor; *VEGFR A/B/C* = vascular endothelial growth factor receptor A/B/C; *AR* = androgen receptor; *BCL2* = B-cell lymphoma 2; DFS = disease-free survival; OS = overall survival; PARP = poly(ADP-ribose) polymerase; *PI3K* = phosphoinositide 3-kinase; *AKT* = AKT serine/threonine kinase; *mTOR* = mechanistic target of rapamycin; pCR = pathologic complete response; CMF = cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil; *BRC1/2* = breast cancer gene 1/2; *FGFR1/2* = fibroblast growth factor receptor 1/2; *PIK3CA* = phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α .

Genetic Markers in TNBC

on the genetic basis of TNBC.^{35,36} Genetic markers that influence prognosis and/or prediction of appropriate therapy are summarized in Table 2 and visualized in Figure 1.

The exome-sequencing, RNA-sequencing, high-resolution single nucleotide polymorphism arrays and targeted deep resequencing were performed on 104 primary TNBC samples grouped into various subsets to reveal the patterns of somatic mutation.³⁵ The most frequent copy number aberrations were identified for the *PARK2* (Parkinson disease 2) (6%), *RBI* (retinoblastoma gene 1) (5%), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) (3%), and *EGFR* (epidermal growth factor receptor) (5%) genes. *TP53* mutations were found to be the most common somatic aberration, observed in 53.8% of cases, while the TNBC samples also showed frequent mutations in the *PIK3CA* (10.2%), *USH2A* (usher syndrome 2A) (9.2%), *MYO3A* (myosin IIIA) (9.2%), *PTEN*, and *RBI* genes (7.7%). However, only a minority of mutations (36%) were transcribed into mRNA.³⁵

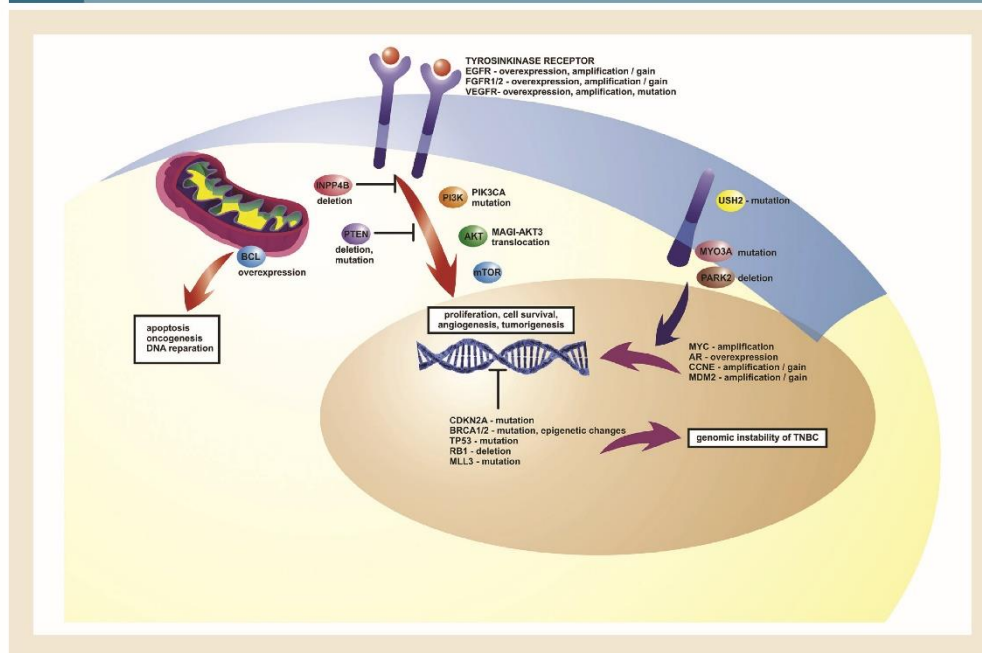
The Cancer Genome Atlas Group analyzed samples from 463 patients using genomic DNA copy number arrays, DNA methylation, exome sequencing, mRNA arrays, microRNA sequencing, and reverse-phase protein arrays.³⁶ In a group containing 93 basal-like tumors (76 TNBCs), the most commonly mutated genes were found to be *TP53* (80%), *PIK3CA* (9%), *MLL3* (lysine

methyltransferase 2C) (5%), *AFF2* (AF4/FMR2 family member 2) (4%), *RBI* (4%), and *PTEN* (1%). Copy number alterations were observed in several chromosomal regions or genes, namely amplification or gain of *MYC* (MYC protooncogene) (40%), (E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2) (14%), *CCNE* (cyclin E1) (9%), as well as the 1q and 10p regions, along with loss of *PTEN*, *RBI*, *INPP4B* (inositol polyphosphate-4-phosphatase type II B) (30%), and the 8p and 5q regions. Heightened *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) expression, decreased *RBI* expression, and high genomic instability were also found to be typical features of the BLBC profile.³⁶

The discovery of the fusion gene *EML4-ALK* (echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase) in non-small-cell lung cancer fueled interest in finding such a structural rearrangement in breast carcinomas, particularly in TNBC.^{77,78} An enrichment in most known *MAGI3-AKT3* (membrane-associated guanylate kinase-AKT serine/threonine kinase 3) translocation as well as rearrangements involving the *NOTCH1/2* (Notch 1/2) and *MAST* (microtubule-associated serine-threonine kinase) genes, were identified in TNBC by whole exome sequencing.^{77,79}

As was mentioned above, TNBC disease showed higher sensitivity to neoadjuvant chemotherapy, but patients with residual

Figure 1 Genetic Markers and Their Aberrations That Influence Prognosis And/Or Prediction of TNBC



Abbreviations: *AKT* = AKT serine/threonine kinase; *BCL* = B-cell lymphoma; *BRCA1/2* = breast cancer gene 1/2; *CDKN2A* = cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; *EGFR* = epidermal growth factor receptor; *FGFR1/2* = fibroblast growth factor receptor 1/2; *INPP4B* = inositol polyphosphate-4-phosphatase type II B; *MLL3* = lysine methyltransferase 2C; *mTOR* = mechanistic target of rapamycin; *MYO3A* = myosin IIIA; *PARK2* = Parkinson disease 2; *PI3K* = phosphoinositide 3-kinase; *PTEN* = phosphatase and tensin homolog; *RBI* = retinoblastoma gene 1; *TP53* = tumor protein P53; *USH2* = Usher syndrome 2; *VEGFR* = vascular endothelial growth factor receptor.

disease have very poor prognosis. Identification of targetable alteration in residual tumor is therefore necessary.⁸⁰ The genomic profile of tumor has been shown to be frequently altered during chemotherapy. Several studies comparing pretreatment and posttreatment biopsy samples found significant changes mainly in cell-cycle regulators and PI3K/mTOR pathway.^{81,82} These genomic changes could be the reason for resistance to conventional chemotherapies and identification of new druggable targets in posttreatment biopsy samples could significantly improve TNBC outcome. Molecular analysis of posttreatment biopsy samples is therefore necessary in TNBC patients who do not experience pCR after neoadjuvant chemotherapy.

TP53 Gene

TP53 is one of the most important genes involved in maintaining homeostasis and genomic integrity throughout cell-cycle arrest, DNA repair, and apoptosis. Alterations of *TP53* associated with aberrant p53 expression have been described in numerous types of human cancers as well as in all breast cancer subtypes.⁸³ Expression of mutant p53 was found to be associated with high proliferation rate, early disease recurrence, and early death in node-negative breast cancer.³⁷ In breast cancer, the DNA-binding domain is the most frequently mutated area of the *TP53* gene, and missense substitutions were identified as the culprit behind unfavorable breast cancer outcomes.^{35,36,84} While missense mutations have been found to be predominantly associated with the luminal subtype, nonsense and frameshift changes are prevalent in basal-like tumors.³⁶ Generally, *TP53* mutations are more common in ER-negative breast cancers than in breast cancers with ER expression.^{38,85} Moreover, ER-negative patients with p53 expression (TNBC and HER2-positive subtypes) were reported to have a better prognosis, while p53 expression in ER-positive patients was related to a worse prognosis.^{38,39}

In TNBC, *TP53* is the most frequently mutated gene, with mutations occurring in 65% to 80% of cases.^{35,36} In one of the most extensive studies to date, mutations in *TP53* were found in 62% of basal-like and 43% nonbasal TNBC.³⁵ In the context of TNBC, these mutations result in increased genetic instability and cytogenetic changes, as well as a higher probability of loss of heterozygosity.^{86,87} Recent studies have shown worse OS and increased metastatic risk in TNBC patients with decreased p53 function.^{40,56} However, another study did not confirm that mutations of *TP53* and/or p53 expression are prognostic factors; nevertheless, discrepancies between *TP53* mutation and p53 expression could be a potential predictor of poor outcome in TNBC.⁸⁸ Other studies found *TP53* mutations to be a predictor of chemoresistance in TNBC.⁴¹⁻⁴³ Taken together, *TP53* is mutated in a majority of TNBC cases and is therefore an attractive candidate for antitumor therapies.

BRCA1/2

The *BRCA1* and *BRCA2* gene products are vital to the activation and transcriptional regulation of DNA damage, control of the cell cycle, and cellular proliferation and differentiation.⁸⁹ More specifically, BRCA1/2 proteins play an essential role in DNA double-strand break repair by homologous recombination (HRR) and the maintenance of DNA stability.⁹⁰

Over 80% of hereditary *BRCA1*-mutated breast cancers are classified as TNBC and/or BLBC, and approximately 15% TNBC

patients are carriers of a *BRCA* germ-line mutation (g*BRCA*).^{3,91-95} The remaining sporadic TNBC cases frequently share certain characteristics with *BRCA1/2* mutation carriers in HRR defects, sometimes collectively termed BRCAness.⁵⁹ This BRCAness status can involve the epigenetic inactivation of *BRCA1* by promoter methylation, which has been associated with poor prognosis in terms of relapse-free survival and OS after anthracycline- or taxane-based therapy.³⁶ Breast cancers with *BRCA1* mutations as well as BRCAness often express basal markers that correspond with the BL1 subtype and therefore respond to neoadjuvant anthracycline and taxane therapy.^{2,23,97} Interesting results were recently published in the POSH study determining the effect of g*BRCA* on breast cancer outcome after systemic therapy. OS at 10 years was 78% in g*BRCA* carriers compared to 69% in *BRCA*-negative cases, suggesting that *BRCA* mutation provided some survival advantage to their carriers.⁹⁸ Better survival of g*BRCA* TNBC and probably also BRCAness might be caused by better sensitivity of g*BRCA* carriers to chemotherapy as a result of defects in HRR or higher immune activation.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Moreover, patients with deficient BRCA1/2 function should be more susceptible to DNA-damaging agents like platinum derivatives and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors.⁴⁴ The Treating to New Targets (TNT) trial shown the double objective response rate to carboplatin compared to docetaxel in metastatic TNBC tumors carrying g*BRCA* mutations.^{101,102} High effectiveness of platinum-based therapy in metastatic g*BRCA* TNBC was also demonstrated by other studies.⁴⁵ Moreover, not only *BRCA1/2* mutation carriers but also patients with advanced TNBC with defects in the BRCA1/2 pathway (determined by higher values of loss of heterozygosity score and large-scale state transitions score) showed a positive response to platinum therapy in the TBCR009 study.⁴⁵ Indeed, the TNT trial did not demonstrate better response to carboplatin in patients with a high homologous recombination deficiency score.¹⁰¹ Biomarkers of genomic instability that predict a positive response to platinum-based therapy should therefore be validated for a subset of TNBC tumors.¹⁰³ In the neoadjuvant setting, the role of g*BRCA* mutation in response to platinum-based therapy is unclear. Several studies demonstrated higher responses in g*BRCA* carriers; nevertheless, the GeparSixto study showed higher responses in patients with wild-type *BRCA*.^{46,104-106}

PARP inhibitors present another promising therapeutic tool. PARP inhibition increases the occurrence of irreparable toxic DNA double-strand breaks resulting in cell death in *BRCA*-mutated patients. PARP inhibitors therefore effectively kill the tumor cells through the principle of synthetic lethality. The PARP inhibitors olaparib and rucaparib have been approved for the treatment of advanced previously treated ovarian cancer with g*BRCA*. More recently, olaparib was also approved by the US Food and Drug Administration for treatment of metastatic HER2-negative breast cancer with *BRCA* mutation previously treated with chemotherapy.¹⁰⁷⁻¹¹¹ Promising results with PARP inhibitor talazoparib were shown in the EMBRACA study. Talazoparib therapy resulted in significantly prolonged progression-free survival in advanced HER2-negative breast cancer patients with g*BRCA* compared to treatment of physician's choice.¹¹²

PI3K Pathway

Dysregulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway causes changes in cell survival, differentiation, and/or proliferation that are

Genetic Markers in TNBC

frequently observed during carcinogenesis.⁵⁴ Increased signaling through the PI3K/Akt/mTOR pathway is very common in all breast cancer types, including TNBC.¹¹³ In basal-like tumors, alterations in *PTEN* and *INPP4B* phosphatases are more common than mutations in *PIK3CA*.^{55,54} *PIK3CA* mutations are associated with ER positivity and therefore are more frequent in ER-positive breast cancers (luminal and HER2-enriched subtypes).^{77,114}

PTEN is an important negative regulator of the PI3K pathway. Loss of PTEN expression has been shown to be significantly associated with ER negativity as well as basal-like phenotype.¹¹⁵ Loss of PTEN contributes to both rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in TNBC.⁵⁵ The phosphatase INPP4B, another negative regulator of the PI3K pathway, has been shown to be frequently lost in ER-negative primary breast carcinomas. INPP4B loss is associated with high clinical grade, increased tumor size, loss of hormone receptors, and aggressive basal-like breast cancers.^{36,116} In addition, oncogenic mutations of *PIK3CA*, which encodes for a catalytic subunit of PI3K (p110 α), occur in about 10% of TNBC cases and can further activate the PI3K pathway. Among the TNBC subtypes, LAR shows the highest prevalence of *PIK3CA* mutations, and in this way the simultaneous therapeutic targeting of AR and *PIK3CA* could prove beneficial to patients.⁵¹ In addition to the known TNBC cancer-related genes involved in PI3K pathway regulation, the novel MAGI3-AKT3 translocation has been described. This rearrangement occurs in about 7% of TNBC cases and leads to constitutive AKT3 activation and hyperactivation of the PI3K pathway.⁷⁷

In TNBC, PI3K/AKT/mTOR pathway alterations occur frequently and are promising therapeutic targets. Preclinical data have demonstrated that TNBC tumors are more sensitive to combination therapy.⁵¹⁻⁵³ Clinical trials are currently evaluating the potency of mTOR, PI3K, AKT, and mTOR/PI3K inhibitors for treating TNBC alone or in combination with other therapies (eg, cisplatin, PARP, and AR inhibitors).¹¹⁴

Tyrosine Kinase Receptors

Tyrosine kinase receptors from the *EGFR*, *FGFR* (fibroblast growth factor receptor), and *VEGFR* (vascular endothelial growth factor receptor) families have been reported to be potential clinical targets for treating TNBC.^{117,118} The tyrosine kinase receptor EGFR (HER1) mediates cell proliferation, angiogenesis, and metastasis as well as the inhibition of apoptosis by transducing an extracellular signal through a kinase cascade to ultimately initiate the transcription of specific genes. While EGFR overexpression has been described in approximately 60% of TNBC cases, *EGFR* amplification or high copy number has been reported in only 5% to 30% of cases. Moreover, *EGFR* mutations were found to be rare, occurring in about 11% of samples.^{56,57} Studies of Asian populations did not find a correlation between EGFR expression and either increased *EGFR* copy number or *EGFR* mutations.^{57,119} Nevertheless, a recent study reported *EGFR* copy number to correlate with *EGFR* overexpression and to be associated with poor clinical outcome in TNBC. EGFR overexpression is also influenced by factors other than genomic changes, and *EGFR* copy number status seems to predict the response of TNBC patients to anti-EGFR therapy.⁵⁸ A number of clinical trials have evaluated the efficacy of tyrosine kinase inhibitors as well as monoclonal

antibodies.¹¹⁷ However, the results from these clinical trials, which tested EGFR tyrosine kinase inhibitors alone or in combination with chemotherapy, have so far been disappointing.¹¹⁷ Similarly, clinical trials investigating anti-EGFR monoclonal antibodies in monotherapy or combination therapy have not yet provided any promising results.¹²⁰⁻¹²³ Despite predominantly unsuccessful studies, a small proportion of TNBC patients have disease that responds positively to anti-EGFR therapy. Therefore, identification of patients with EGFR activations who may profit from anti-EGFR therapy is crucial.

FGF receptors mediate proliferation, survival, migration, and differentiation. As such, they could be a promising target for treating a subset of TNBC patients. Amplifications of *FGFR1* or *FGFR2*, with respective frequencies of 9% and 4% in TNBC, may act as driver mutations, whereas mutations in *FGFR* genes are less common in TNBC.⁵⁹⁻⁶¹ Two studies have shown that *FGFR2* amplification leads to constitutive activation of the receptor in TNBC cell lines, and that this subset of cells is sensitive to the FGFR ATP-competitive inhibitor PD173074.^{59,63} Cell lines with *FGFR1* amplifications were shown to be sensitive to the FGFR ATP-competitive inhibitor brivanib.⁶² These results concerning FGFRs, along with the fact that alterations in *FGFR* genes occur in more than 10% of TNBC cases, make this family of tyrosine kinase receptors an attractive therapeutic target. Ongoing clinical trials will, we hope, clarify the effectiveness of FGFR inhibitors in breast cancer patients.

The VEGFR family has also been explored as a potential therapeutic target because it plays an essential role in angiogenesis, which affects cancer development, invasion, and metastasis.⁶⁴ Even though *VEGFR* amplifications or mutations are rare in TNBC, a number of clinical trials have confirmed that the addition of bevacizumab to chemotherapy significantly elevates pCR rates in TNBC patients.^{28,65,66} Higher pCR rates occur in TNBC patients treated with bevacizumab; interestingly, the best responses to bevacizumab were associated with high VEGFR1 levels.⁶⁷ The effect of the multitarget tyrosine kinase receptor inhibitor sunitinib on TNBC has been evaluated in several studies, but this inhibitor was not found to be any more effective than other previously reported therapeutic approaches.^{124,125}

Androgen Receptor

AR, as well as ER and PR, belongs to the nuclear steroid hormone receptor family.¹²⁶ AR plays an important role in cell signaling through the Wnt pathway and regulates genes involved in metastasis,⁶⁸ FOXA1, PTEN, and p53 along with other cell-cycle regulators, and the PI3K/AKT/mitogen-activated protein kinase signaling pathway.¹²⁷ AR expression has been found in approximately 70% of breast cancers, and it is associated with ER positivity.^{47,128} In breast cancer, AR positivity is more common in older women and is associated with lower stage, nuclear grade, and risk of lymph node involvement as well as smaller tumor size at diagnosis, decreased risk of recurrence, and better OS and disease-free survival.^{69,129,130} In TNBC, AR positivity is present in 13% to 37% of cases and is associated with LAR subtype and older age at presentation.^{130,131} The prognostic significance of AR positivity is controversial; AR positivity has been associated with both favorable and poor prognoses in previous studies.^{69,70,131-133} AR-positive

TNBC has a lower Ki-67 index than AR-negative TNBC and could therefore be less sensitive to chemotherapy,¹³⁴ which is in accordance with findings that the LAR subtype has lower pCR rates relative to other TNBC subtypes.²³

Preclinical *in vitro* and xenograft studies have demonstrated that cell line models of LAR subtype are partially dependent on AR signaling.^{22,135} Small interfering RNA knockdown and pharmacologic inhibition of AR both substantially decreased cell viability and tumor growth. Moreover, all analyzed LAR cell lines showed an activating mutation in the kinase domain of *PIK3CA* (H1047R) and were therefore sensitive to PI3K inhibitors.² In AR-positive TNBC, *PIK3CA* mutations were reported in approximately 40% of cases.⁵¹ Studies using *in vitro* experiments and xenograft models have shown that the treatment of both LAR and non-LAR TNBC subtypes with the AR inhibitors enzalutamide and bicalutamide reduces proliferation, anchorage-independent growth, migration, and invasion, and increases apoptosis.^{71,72} Therefore, a positive response to AR antagonists is probably not limited to the LAR TNBC subtype. However, the TBCRC011 study showed a relatively weak response, with a 6-month clinical benefit rate of 19% for bicalutamide in AR-positive patients compared to 18% in the intention-to-treat population.¹³⁶ In a MDV3100-11 study, enzalutamide showed higher clinical activity, with a 6-month clinical benefit rate of 28%, for AR-positive patients compared to 20% in the intention-to-treat population.¹³⁷

Future studies should focus on elucidating the mechanisms of AR therapy resistance and how to select patients who will show the optimal response. Other therapeutic approaches, such as CYP17 (cytochrome P450 family 17 subfamily a member 1) inhibitors or the combination of AR inhibitors with CDK4/CDK6 (cyclin-dependent kinase) inhibitors, PI3K inhibitors or neoadjuvant chemotherapy, are still being investigated.¹³⁰

The therapeutic value of screening for AR positivity is that this is an easily detectable marker than can identify subgroups of TNBC patients who will derive minimal clinical benefit from standard chemotherapy. AR-dependent TNBC patients could benefit from targeted therapy based on AR antagonists alone or in combination with other chemical agents.

BCL2 Gene

B-cell lymphoma 2 (BCL2) is a mitochondrial protein known for its antiapoptotic and oncogenic effects. BCL2 exerts inhibitory effects on cell growth and proliferation and DNA damage, resulting in increased genetic instability.^{138,139} Many studies have proven BCL2 expression to be a promising prognostic and predictive marker, especially in hormone receptor-positive, node-negative breast cancer.^{140,141} BCL2 expression is directly up-regulated by estrogens and therefore commonly shows elevated levels in ER-positive breast cancers.

The role of BCL2 in the context of TNBC has not yet been well established. BCL2 positivity was found to be a positive prognostic factor in TNBC, as the ER⁻BCL2⁺ group demonstrated a better prognosis than the ER⁺BCL2⁻ group.⁷³ Moreover, BCL2 positivity was shown to be a predictor of response to neoadjuvant and adjuvant anthracycline-based chemotherapy. The absence of BCL2 expression in prechemotherapy TNBC samples was associated with a higher probability of pCR to neoadjuvant doxorubicin-based chemotherapy, and the lack of BCL2 expression was also found to be an independent

predictor of pCR.⁷⁴ Similarly, in an adjuvant setting, low BCL2 expression was associated with better outcome when TNBC was treated with anthracycline-based chemotherapy.⁷⁵ In addition, heightened BCL2 expression seems to predict response to cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil treatment.⁷⁶ The mechanism of this response is not entirely clear, but it may be influenced by expression changes in genes associated with BCL2 levels—for example, altered expression of HER3 (human epidermal growth factor receptor 3), MDM4 (Mdm2-like P53-binding protein), and p27 proteins.¹⁴² The addition of BCL2 to the screening panel in clinical practice would be simple and could provide important prognostic and predictive information about the TNBC patient.

Cyclin-Dependent Kinases

CDKs and cyclins play key roles in cell-cycle regulation and are altered in almost all cancer types. Altered expression of cyclin D, cyclin E, CDK4/6, CDK2, and others was observed in TNBC, and CDK inhibition therapy therefore seems to be promising strategy in TNBC.^{81,143,144} More than 10 CDK inhibitors are evaluating in ongoing clinical trials; the most promising are ribociclib, palbociclib, abemaciclib, and dinaciclib. The CDK4/6 inhibitors ribociclib and palbociclib have been already approved for treatment of advanced breast cancer patients with hormone receptor positivity and HER2 negativity.^{145,146} In TNBC, the LAR subgroup was found to be sensitive to CDK4/6 inhibition (palbociclib/ribociclib). Moreover, CDK4/6 inhibitors were synergistic with PI3K inhibitors in TNBC cell lines with *PIK3CA* mutation.¹⁴⁷ Recently, inhibition of CDK4/6 was found to block breast tumor metastasis in TNBC xenograft model. Palbociclib inhibition did not affect growth of primary tumor but nevertheless significantly inhibited the spread of TNBC to distant organs through destabilization of the SNAIL1 protein.¹⁴⁸ Currently, palbociclib and ribociclib in combination with bicalutamide (AR antagonist) are being tested for the treatment of advanced AR-positive TNBC.¹⁴⁹ Abemaciclib has a different toxicity profile and is being tested in advanced TNBC with high RB1 expression as a single agent.¹⁴⁹ Dinaciclib (a pan-CDK inhibitor) was recently shown to have activity against TNBC both *in vitro* and *in vivo*.¹⁵⁰ Dinaciclib failed in combination with epirubicin because of substantial toxicity and is currently being tested in combination with pembrolizumab.^{149,151}

Conclusion

TNBC encompasses a complex group of heterogeneous diseases characterized by various genetic alterations and a lack of validated biomarkers. Current research is focused on identifying genes that may serve as therapeutic targets, prognostic markers, or predictors of therapeutic response and are common in all or particular TNBC subtypes. High-throughput analysis tools such as sequencing and microarray technology have the potential to elucidate the nature of TNBC; however, results of these technologies rarely have therapeutic impact. Well-defined and extensive data sets are required for clinical validation of founded biomarkers. To date, several promising markers have been described, but they still lack validation with the stringent criteria of clinical studies. The heterogeneity of TNBC is also evident in its treatment. The different subtypes differ in both proliferative activity and response to conventional chemotherapy; as such, classic therapeutic approaches should consider which subtype is being targeted until personalized options become available.

Genetic Markers in TNBC

Acknowledgment

Supported by grant NPS I LO1304 from the Czech Ministry of Education, Youth and Sports.

Disclosure

The authors have stated that they have no conflict of interest.

References

1. Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pictetpol JA. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer* 2015; 121:8-16.
2. Lehmann BD, Pictetpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol* 2014; 232:142-50.
3. Oakman C, Viale G, Di Leo A. Management of triple negative breast cancer. *Breast* 2010; 19:312-21.
4. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer* 2007; 109:1721-8.
5. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006; 295:2492.
6. Liedtke C, Hess KR, Kain T, et al. The prognostic impact of age in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 138:591-9.
7. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; 13:4429-34.
8. Morris GJ, Mitchell EP. Higher incidence of aggressive breast cancers in African-American women: a review. *J Natl Med Assoc* 2008; 100:698-702.
9. Heitz F, Harter P, Luck HJ, et al. Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur J Cancer* 2009; 45:2792-8.
10. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer* 2012; 118:5463-72.
11. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2010; 28:3271-7.
12. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19:264-71.
13. Crisicciello C, Azim HA, Schouten PC, Linn SC, Sotiriou C. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 2012; 23(suppl 6): vi13-8.
14. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-52.
15. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:10869-74.
16. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27:1160-7.
17. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:10393-8.
18. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 2006; 49:22-34.
19. Rakha EA, Elsheikh SF, Aleskandarany MA, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res* 2009; 15:2302-10.
20. Bertucci F, Finetti P, Carverna N, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 2008; 123:236-40.
21. Prat A, Adamo B, Cheang MCU, Anders CK, Carcy IA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* 2013; 18:123-33.
22. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011; 121:2750-67.
23. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2013; 19:5533-40.
24. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12:R68.
25. Bertucci F, Finetti P, Carverna N, et al. Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. *Cancer Res* 2006; 66:4636-44.
26. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, et al. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PLoS One* 2016; 11, e0157368.
27. Adams S, Gray RJ, Demaria S, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: FCOG 2197 and FCOG 1199. *J Clin Oncol* 2014; 32:2959-66.
28. Gerber B, Loibl S, Eidtmann H, et al. Neoadjuvant bevacizumab and anthracycline-taxane-based chemotherapy in 678 triple-negative primary breast cancers: results from the geparquinto study (GBG 44). *Ann Oncol* 2013; 24:2978-84.
29. Loi S, Michiels S, Salgado R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol* 2014; 25:1544-50.
30. Dieci MV, Crisicciello C, Goubar A, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol* 2014; 25:611-8.
31. Garcia-Martinez E, Gil GL, Benito AC, et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2014; 16:488.
32. Denkert C, von Minckwitz G, Brasc JC, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol* 2015; 33:983-91.
33. Farmer P, Boniccioli H, Becette V, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24:4660-71.
34. Rampurwala M, Wisinski KB, O'Regan R. Role of the androgen receptor in triple-negative breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2016; 14:186-93.
35. Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012; 486:395-9.
36. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490:61-70.
37. Allred DC, Clark GM, Ellledge R, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:200-6.
38. Coates AS, Millar EKA, O'Toole SA, et al. Prognostic interaction between expression of p53 and estrogen receptor in patients with node-negative breast cancer: results from IBCSG trials VIII and IX. *Breast Cancer Res* 2012; 14:R143.
39. Kurosumi K, Kurosumi M, Oba H, et al. Pathological tumor response to neoadjuvant chemotherapy using anthracycline and taxanes in patients with triple-negative breast cancer. *Exp Ther Med* 2011; 2:257-64.
40. Powell E, Shao J, Yuan Y, et al. p53 deficiency linked to B cell translocation gene 2 (BTG2) loss enhances metastatic potential by promoting tumor growth in primary and metastatic sites in patient-derived xenograft (PDX) models of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2016; 18:13.
41. Aas T, Borresen AL, Geisler S, et al. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:811-4.
42. Geisler S, Lønning PE, Aas T, et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61:2505-12.
43. Chae BJ, Bae JS, Lee A, et al. p53 as a specific prognostic factor in triple-negative breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2009; 39:217-24.
44. Plummer R. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: a new direction for BRCA4 and triple-negative breast cancer? *Breast Cancer Res* 2011; 13:218.
45. Isakoff SJ, Mayer FL, He L, et al. TBCRC009: a multicenter phase II clinical trial of platinum monotherapy with biomarker assessment in metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33:1902-9.
46. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, et al. Efficacy of neoadjuvant cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:1145-53.
47. Loibl S, Müller BM, von Minckwitz G, et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 130:477-87.
48. Chen X, Yuan Y, Garfield DH, Wu J, Huang Q, Shen K. Both carboplatin and bevacizumab improve pathological complete remission rate in neoadjuvant treatment of triple negative breast cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9, e108405.
49. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; BRG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15:747-56.
50. Rugo HS, Barry WT, Moreno-Aspitia A, et al. Randomized phase III trial of paclitaxel once per week compared with nanoparticle albumin-bound nab-paclitaxel once per week or ixabepilone with bevacizumab as first-line chemotherapy for locally recurrent or metastatic breast cancer: CAIGB 40502/NCCTG N06311 (Alliance). *J Clin Oncol* 2015; 33:2361-9.
51. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res* 2014; 16:406.
52. De P, Sun Y, Carlson JH, Friedman LS, Leyland-Jones BR, Dey N. Doubling down on the PI3K-AKT-mTOR pathway enhances the antitumor efficacy of PARP inhibitor in triple negative breast cancer model beyond BRCA-ness. *Neoplasia* 2014; 16:43-72.
53. Gordon V, Bancrji S. Molecular pathways: PI3K pathway targets in triple-negative breast cancers. *Clin Cancer Res* 2013; 19:3738-44.
54. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296:1655-7.
55. Beg S, Straj AK, Prabhakaran S, et al. Loss of PTEN expression is associated with aggressive behavior and poor prognosis in Middle Eastern triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 151:541-53.
56. Kim Y, Kim J, Lee HD, Jeong J, Lee W, Lee KA. Spectrum of EGFR gene copy number changes and KRAS gene mutation status in Korean triple negative breast cancer patients. *PLoS One* 2013; 8, e79014.
57. Teng YH, Tan WJ, Thike AA, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in triple negative breast cancer: possible implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res* 2011; 13:R35.

58. Park HS, Jang MH, Kim EJ, et al. High *EGFR* gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol* 2014; 27:1212-22.
59. Turner N, Lambros MB, Horlings HM, et al. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene* 2010; 29:2013-23.
60. Lehmann BD, Pictetpol JA, Tan AR. Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and new targets for therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ B* 2015; 35:e31-9.
61. Cerami E, Gao J, Dogruoz U, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data: figure 1. *Cancer Discov* 2012; 2:401-4.
62. Shiang CY, Qi Y, Wang B, et al. Amplification of fibroblast growth factor receptor-1 in breast cancer and the effects of brivanib alaninate. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 123:747-55.
63. Sharpe R, Pearson A, Herrera-Abreu MT, et al. FGFR signaling promotes the growth of triple-negative and basal-like breast cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2011; 17:5275-86.
64. Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-76.
65. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603. *J Clin Oncol* 2015; 33:13-21.
66. von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezaei M, et al. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:299-309.
67. Tolancy SM, Boucher Y, Duda DG, et al. Role of vascular density and normalization in response to neoadjuvant bevacizumab and chemotherapy in breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112:14325-30.
68. Naderi A, Hughes-Davies L. A functionally significant cross-talk between androgen receptor and ErbB2 pathways in estrogen receptor negative breast cancer. *Neoplasia* 2008; 10:542-8.
69. Qu Q, Mao Y, Fei X, Shen K. The impact of androgen receptor expression on breast cancer survival: a retrospective study and meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8, e82650.
70. Tang D, Xu S, Zhang Q, Zhao W. The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast cancer. *Med Oncol* 2012; 29:526-33.
71. Zhu A, Li Y, Song W, et al. Antiproliferative effect of androgen receptor inhibition in mesenchymal stem-like triple-negative breast cancer. *Cell Physiol Biochem* 2016; 38:1003-14.
72. Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, et al. Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Mol Cancer Ther* 2015; 14:769-78.
73. Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, et al. *BCL2* in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer* 2010; 103:668-75.
74. Puszta L, Krishnamurti S, Perez Cardona J, et al. Expression of BAG-1 and Bcl-2 proteins before and after neoadjuvant chemotherapy of locally advanced breast cancer. *Cancer Invest* 2004; 22:248-56.
75. Bouchalova K, Svoboda M, Kharishvili G, et al. *BCL2* is an independent predictor of outcome in basal-like triple-negative breast cancers treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Tumour Biol* 2015; 36:4243-52.
76. Bouchalova K, Kharishvili G, Bouchal J, Vrbkova J, Megova M, Hlobilkova A. Triple negative breast cancer—*BCL2* in prognosis and prediction. *Curr Drug Targets* 2014; 15:1166-75.
77. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 2012; 486:405-9.
78. Shaver TM, Lehmann BD, Beeler JS, et al. Diverse, biologically relevant, and targetable gene rearrangements in triple-negative breast cancer and other malignancies. *Cancer Res* 2016; 76:4850-60.
79. Robinson DR, Kalpana-Sundaram S, Wu YM, et al. Functionally recurrent rearrangements of the MAST kinase and Notch gene families in breast cancer. *Nat Med* 2011; 17:1646-51.
80. Parca J, Geyer FC, Marchio C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ Breast Cancer* 2016; 2:16036.
81. Balko JM, Giltman JM, Wang K, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov* 2014; 4:232-45.
82. Tan SH, Sapari NS, Miao H, et al. High-throughput mutation profiling changes before and 3 weeks after chemotherapy in newly diagnosed breast cancer patients. *PLoS One* 2015; 10, e0142466.
83. Hussain SP, Harris CC. p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. *J Nippon Med Sch* 2006; 73:54-64.
84. Végan F, Rebutti M, Chevrier S, Cadouat M, Boidot R, Lizard-Nacol S. Only missense mutations affecting the dna binding domain of p53 influence outcomes in patients with breast carcinoma. *PLoS One* 2013; 8, e51103.
85. Langerød A, Zhao H, Borgon Ø, et al. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007; 9:R30.
86. Olivier M, Tanjere P. Somatic mutations in cancer prognosis and prediction: lessons from TP53 and EGFR genes. *Curr Opin Oncol* 2011; 23:88-92.
87. Mizuno H, Spike BT, Wahl GM, Levine AJ. Inactivation of p53 in breast cancers correlates with stem cell transcriptional signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:22745-50.
88. Kim JY, Park K, Jung HH, et al. Association between mutation and expression of TP53 as a potential prognostic marker of triple-negative breast cancer. *Cancer Res Treat* 2016; 48:1338-50.
89. Venkataraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002; 108:171-82.
90. D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:23-34.
91. Chacón RD, Costanzo MV. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12:S3.
92. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1482-5.
93. Archley DP, Albarrañin CT, Lopez A, et al. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:4282-8.
94. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33:304-11.
95. Engel C, Rhiem K, Hahnen E, et al. Prevalence of pathogenic BRCA1/2 germline mutations among 802 women with unilateral triple-negative breast cancer without family cancer history. *BMC Cancer* 2018; 18:265.
96. Sharma P, Stecklein SR, Kimler BF, et al. The prognostic value of BRCA1 promoter methylation in early stage triple negative breast cancer. *J Cancer Ther Res* 2014; 3:1-11.
97. Sorlic T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:8418-23.
98. Copson ER, Maishman TC, Tapper WJ, et al. Germline BRCA mutation and outcome in young-onset breast cancer (POSH): a prospective cohort study. *Lancet Oncol* 2018; 19:169-80.
99. Han HS, Déras V, Robson M, et al. Veliparib with temozolomide or carboplatin/paclitaxel versus placebo with carboplatin/paclitaxel in patients with BRCA1/2 locally recurrent/metastatic breast cancer: randomized phase II study. *Ann Oncol* 2018; 29:154-61.
100. Jiang T, Shi W, Wali VB, et al. Predictors of chemosensitivity in triple negative breast cancer: an integrated genomic analysis. *PLoS Med* 2016; 13, e1002193.
101. Tutt A, Tovey H, Cheang MCU, et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT trial. *Nat Med* 2018; 24:628-37.
102. Tutt A, Paul E, Kilburn L, et al. The TNT trial: a randomized phase III trial carboplatin (C) compared with docetaxel (D) for patients with metastatic or recurrent locally advanced triple negative or BRCA1/2 breast cancer (CRUK/07/012). Proceedings of the Thirty-Seventh Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium; December 9-13, 2014; San Antonio, TX. Philadelphia, PA: AACR; 2015. *Cancer Res* 2015; 75(9 suppl) (abstract S3-01).
103. Anders CK, Abramson V, Tan T, Dent R. The evolution of triple-negative breast cancer: from biology to novel therapeutics. *Am Soc Clin Oncol Educ B* 2016; 36:34-42.
104. Hahnen E, Lederer B, Hauke J, et al. Germline mutation status, pathological complete response, and disease-free survival in triple-negative breast cancer. *JAMA Oncol* 2017; 3:1378.
105. Byrski T, Huzarski T, Dent R, et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115:359-63.
106. Gronwald J, Byrski T, Huzarski T, et al. Neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2009; 27:502.
107. Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 2010; 376:235-44.
108. Shen Y, Rehman H, Feng Y, et al. BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency. *Clin Cancer Res* 2013; 19:5003-15.
109. Sandhu SK, Schelmal WR, Wilding G, et al. The poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor niraparib (MK4827) in BRCA mutation carriers and patients with sporadic cancer: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 2013; 14:882-92.
110. Kumar S, Ji J, Morgan R, et al. A phase I study of veliparib in combination with metronomic cyclophosphamide in adults with refractory solid tumors and lymphomas. *Clin Cancer Res* 2012; 18:1726-34.
111. Robson M, Im SA, Senkus E, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *N Engl J Med* 2017; 377:523-33.
112. Litton J, Rugo HS, Eter J, et al. EMBRACA: a phase 3 trial comparing talazoparib, an oral PARP inhibitor, to physician's choice of therapy in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation. Proceedings of the 2017 San Antonio Breast Cancer Symposium; December 5-9, 2017; San Antonio, TX. Philadelphia, PA: AACR; 2018. *Cancer Res* 2018; 78(4 suppl) (abstract G56-07).
113. Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Palla SL, et al. Androgen receptor levels and association with PIK3CA mutations and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15:2472-8.
114. Dey N, De P, Leyland-Jones B. PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: from tumor cell signaling to clinical trials. *Pharmacol Ther* 2017; 175:91-106.
115. Jones N, Bonnet F, Sfar S, et al. Comprehensive analysis of PTEN status in breast carcinomas. *Int J Cancer* 2013; 133:323-34.

Genetic Markers in TNBC

116. Feddele CG, Ooms LM, Ilo M, et al. Inositol polyphosphate 4-phosphatase II regulates PI3K/Akt signaling and is lost in human basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:22231-6.
117. Nakai K, Hung MC, Yamaguchi H. A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res* 2016; 6:1609-23.
118. Cheng CL, Thike AA, Tan SYJ, Chua PJ, Bay BH, Tan PH. Expression of *FGFR1* is an independent prognostic factor in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 151:99-111.
119. Toyama T, Yamashita H, Kondo N, et al. Frequently increased epidermal growth factor receptor (*EGFR*) copy numbers and decreased *BRCA1* mRNA expression in Japanese triple-negative breast cancers. *BMC Cancer* 2008; 8:309.
120. Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30:2615-23.
121. Trédan O, Campone M, Jassem J, et al. Exabeipilone alone or with cetuximab as first-line treatment for advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2015; 15:8-15.
122. Baselga J, Gómez P, Greil R, et al. Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31:2586-92.
123. Nabholz JM, Abrial C, Mouret-Reynier MA, et al. Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. *Ann Oncol* 2014; 25:1570-7.
124. Yardley DA, Shipley DL, Peacock NW, et al. Phase I/II trial of neoadjuvant sunitinib administered with weekly paclitaxel/carboplatin in patients with locally advanced triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 152:557-67.
125. Barrios CH, Liu MC, Lee SC, et al. Phase III randomized trial of sunitinib versus capecitabine in patients with previously treated HER2-negative advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121:121-31.
126. McGhan LJ, McCullough AE, Protheroe CA, et al. Androgen receptor-positive triple negative breast cancer: a unique breast cancer subtype. *Ann Surg Oncol* 2014; 21:361-7.
127. Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C, et al. Androgen receptor inhibits estrogen receptor-activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res* 2009; 69:6131-40.
128. He J, Peng R, Yuan Z, et al. Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med Oncol* 2012; 29:406-10.
129. Vera-Badillo FE, Templeton AJ, de Gouveia P, et al. Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106:djt319.
130. Mina A, Yoder R, Sharma P. Targeting the androgen receptor in triple-negative breast cancer: current perspectives. *Oncotargets Ther* 2017; 10:4675-85.
131. Cawley JA, Lucas FL, Kuller LI, Stone K, Browner W, Cummings SR. Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 1999; 130:270-7.
132. Choi JE, Kang SH, Lee SJ, Bae YK. Androgen receptor expression predicts decreased survival in early stage triple-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2015; 22:82-9.
133. Aleskandarany MA, Abduljabbar R, Ashanlyry I, et al. Prognostic significance of androgen receptor expression in invasive breast cancer: transcriptomic and protein expression analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2016; 159:215-27.
134. Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Christenson JI, Elias A, Richer JK. Androgen receptor biology in triple negative breast cancer: a case for classification as AR⁺ or quadruple negative disease. *Horm Cancer* 2015; 6:206-13.
135. Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res* 2014; 16:R7.
136. Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19:5505-12.
137. Traina TA, Miller K, Yardley DA, et al. Enzalutamide for the treatment of androgen receptor-expressing triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2018; 36:884-90.
138. Wang Q, Gao F, May WS, Zhang Y, Flagg T, Deng X. *Bcl2* negatively regulates DNA double-strand-break repair through a nonhomologous end-joining pathway. *Mol Cell* 2008; 29:488-98.
139. Basu A, Haldar S. The relationship between *Bcl2*, *Bax* and *p53*: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:1099-109.
140. Ali HR, Dawson SJ, Blows FM, et al. A Ki67/BCL2 index based on immunohistochemistry is highly prognostic in ER-positive breast cancer. *J Pathol* 2012; 226:97-107.
141. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:2817-26.
142. Abdel-Atah TMA, Perry C, Dickinson P, et al. *Bcl2* is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings. *Ann Oncol* 2013; 24:2801-7.
143. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347:1566-75.
144. Velasco-Velázquez MA, Li Z, Casimiro M, Loro E, Homsí N, Pestell RG. Examining the role of cyclin D1 in breast cancer. *Future Oncol* 2011; 7:753-65.
145. Walker AJ, Wedam S, Amiri-Kordestani L, et al. FDA approval of palbociclib in combination with fulvestrant for the treatment of hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22:4968-72.
146. US Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/>. Accessed: June 21, 2018.
147. Asghar US, Barr AR, Cutts R, et al. Single-cell dynamics determines response to CDK4/6 inhibition in triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23:5561-72.
148. Liu T, Yu J, Deng M, et al. CDK4/6-dependent activation of DUB3 regulates cancer metastasis through SNAIL1. *Nat Commun* 2017; 8:13923.
149. National Library of Medicine; National Institute of Health. Registered clinical studies information. Available at: <https://clinicaltrials.gov/>. Accessed: June 21, 2018.
150. Rajput S, Khera N, Guo Z, Hoog J, Li S, Ma CX. Inhibition of cyclin dependent kinase 9 by dinaciclib suppresses cyclin B1 expression and tumor growth in triple negative breast cancer. *Oncotarget* 2016; 7:56864-75.
151. Mitri Z, Karakas C, Wei C, et al. A phase 1 study with dose expansion of the CDK inhibitor dinaciclib (SCH727965) in combination with epirubicin in patients with metastatic triple negative breast cancer. *Invest New Drugs* 2015; 33:890-4.

Prognostické a prediktivní faktory u pacientů s karcinomem prsu

Prognostic and predictive factors in breast cancer patients

Mgr. Zuzana Šporiková; MUDr. Vladimíra Koudeláková; MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Ústav molekulární a translační medicíny LF UP, Olomouc



Z. Šporiková

SOUHRN

Současná onkologie se zaměřuje především na hledání nových prognostických a prediktivních biomarkerů, nových terapeutik a léčebných strategií se zaměřením na personalizaci léčby. Současná diagnostika karcinomu prsu se opírá o stanovení exprese estrogenového, progesteronového a HER2 receptoru, jejichž pozitivita predikuje odpověď na endokrinní, respektive anti-HER2 terapii a vypovídá rovněž o prognóze onemocnění. V nedávné době bylo do klinické praxe zavedeno i testování genů *BRCA1* a *BRCA2*, jejichž mutace jsou prediktorem dobré odpovědi na léčbu inhibitory PARP (poly(ADP-ribóza) polymeráza). Za poslední desetiletí byla identifikována celá řada biomarkerů, jejichž klinická validita musí být potvrzena nezávislou prospektivní studií. Význam dostatečně validovaných biomarkerů je pro dnešní personalizovanou onkologii obrovský.

KLÍČOVÁ SLOVA

prognostické markery, prediktivní markery, karcinom prsu, ER, PR, HER2

SUMMARY

Current oncology is mainly focused towards the search of novel prognostic and predictive biomarkers, new therapeutics and therapeutic strategies leading to the development of personalized medicine. Current diagnostics of breast cancer uses the estrogen, progesterone and HER2 expression for prediction of endocrine and anti-HER2 therapy response and prognosis determining. Recently, *BRCA1* and *BRCA2* mutation testing for prediction of response to PARP inhibitors was introduced into clinical practice. In last decade, a number of biomarkers have been identified, however, they must be clinically validated by independent prospective study. The properly validated biomarkers have huge significance in current personalized oncology.

KEY WORDS

prognostic markers, predictive markers, breast cancer, ER, PR, HER2

ÚVOD

Karcinom prsu je celosvětově druhé nejčastější nádorové onemocnění u mužů i žen a nejčastější maligní onemocnění u žen, u nichž zaujímá přibližně čtvrtinu ze všech diagnostikovaných nádorových

onemocnění. Incidence tohoto onemocnění s každým rokem vzrůstá, v roce 2016 bylo v České republice diagnostikováno 7 220 nových případů. Věkově specifická incidence postupně narůstá od 30 do 70 let s maximem mezi 60 a 70 lety. I přes vzrůstající

incidenci však mortalita tohoto onemocnění stagnuje, a to především díky včasnému zachytu a zvyšování účinnosti léčby. Prognóza onemocnění je závislá na stadiu onemocnění, grade, věku a v neposlední řadě na podtypu nádoru a zvolení vhodného léčebného

režimu. Pro volbu správné léčebné strategie je třeba zhodnotit klinicky validované prognostické a prediktivní biomarkery. K prognostickým faktorům patří hodnocení velikosti nádoru, zasažení uzlin, klinické stadium, míra invazivity, histologický typ nádoru a míra exprese Ki-67 a estrogenových (ER), progesteronových (PR) receptorů a HER2 (receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2, human epidermal growth factor receptor 2). V klinické praxi se rozlišuje pět základních typů karcinomu prsu: luminal A-like (ER+ a/nebo PR+, HER-, Ki-67↓), luminal B-like, HER2- (ER+, HER-, PR-, Ki-67↓ / ER+, HER-, PR+, Ki-67↑), luminal B-like, HER2+ (ER+, HER+, PR+/-, Ki-67 ↓/↑), HER2+ (ER-, PR-, HER2+) a basal-like (ER-, PR-, HER-) (tab. 1), které se liší biologickým chováním, prognózou a typem léčby. K nejdůležitějším klinicky používaným prediktivním faktorům u karcinomu prsu v současnosti patří exprese ER, PR, HER2 receptorů a mutace BRCA (breast cancer) genů. Klinicky relevantní prognostické a prediktivní markery u karcinomu prsu jsou shrnuty níže.

ESTROGENOVÉ/PROGESTERONOVÉ RECEPTORY

Expresí estrogenového a progesteronového receptoru (ER/PR) jsou nejstarší používané prediktivní biomarkery, které byly rutinně zavedeny pro individualizaci léčby u karcinomu prsu. Transkripční faktor ER (respektive ERα), aktivovaný vazbou estrogenu, stimuluje proliferaci transkripční genů MYC, cyklin D a dalších. ER navíc stimuluje expresi PR, a PR exprese je proto užívána jako marker funkčního ER. V přítomnosti gestagenů však PR asociuje s ER, mění jeho DNA (deoxyribonukleová kyselina) a vazebné místo, a dochází tak k expresi genů asociovaných se zástavou buněčného cyklu, apoptózou a diferenciací. ER

nebo PR pozitivita je přítomna u téměř tří čtvrtin případů karcinomu prsu, pacienti s ER+/PR+ mají lepší odpověď na endokrinní terapii než ER+/PR- pacienti.^{1,2} Léčba ER/PR pozitivních nádorů je založena na ER modulátorech, selektivní degradaci ER, inhibitech aromatázy a LH-RH analogiích (tab. 2).

Přestože je exprese wild-type ER prediktorem dobré odpovědi na endokrinní terapii, mutace v ligand-vazebné doméně genu pro ER (*ESR1*) jsou spojovány se získanou rezistencí na tuto léčbu. *ESR1* mutace se vyskytují u 10–40 % případů karcinomu prsu, obzvláště u pacientů dlouhodobě léčených inhibitory aromatázy. Překonání této rezistence je momentálně předmětem mnoha prospektivních i retrospektivních klinických studií.

Imunohistochemické stanovení exprese ER/PR patří k základním vyšetřením nově diagnostikovaných i rekurentních karcinomů prsu. Podle doporučení Americké společnosti pro klinickou onkologii (American Society of Clinical Oncology, ASCO) a Vysoké školy amerických patologů (College of American Pathologist, CAP) je hranice positivity stanovena na 1 % ER/PR pozitivních jader.

RECEPTOR PRO LIDSKÝ EPIDERMÁLNÍ RŮSTOVÝ FAKTOR 2

Gen pro *HER2* (receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2) patří do rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor (HER/EGFR/ErbB), je lokalizován na chromosomu 17q12 a kóduje transmembránový tyrozinkinázový protein p185. Hlavní funkce tohoto receptoru je regulace buněčného růstu a diferenciacie indukovaná pomocí MAPK a PI3K/AKT signálních kaskád. Amplifikace *HER2* genu, způsobující nadměrnou expresi proteinu p185, bývá nalezena přibližně u 15–20 % případů karcinomu prsu. HER2-pozitivní nádory prsu

jsou agresivnější, většinou málo diferenciované, s častým postižením lymfatických uzlin, výskytem distálních metastáz často do centrální nervové soustavy (CNS) a nepřítomností hormonálních receptorů a jsou méně citlivé na standardní chemoterapii. HER2 amplifikace/overexpresie je nezávislým negativním prognostickým faktorem. I přes špatnou prognózu je HER2-pozitivita prediktorem dobré odpovědi na anti-HER2 terapii. První cílená léčba proti HER2 receptoru byla humanizovaná monoklonální protilátka trastuzumab. Trastuzumab blokuje ligand-independentní dimerizaci a navozuje protinádorovou imunitní odpověď, zahrnující buněčnou cytotoxicitu, zástavu buněčného cyklu, apoptózu a inhibici angiogeneze.³ Trastuzumab je schválen v různých kombinacích pro léčbu karcinomu prsu v neoadjuvantním, adjuvantním i paliativním režimu. Pro cílenou HER2 terapii je v současné době vyjma trastuzumabu schváleno několik dalších druhů léčby s různými mechanismy účinku (tab. 2). Hlavním problémem zůstává získaná rezistence, která se vyvine u většiny léčených HER2-pozitivních případů.

Vyšetření HER2-pozitivity, společně s vyšetřením ER/PR exprese je v současné době nejdůležitějším diagnostickým, prognostickým a prediktivním vyšetřením u karcinomu prsu. Pro testování HER2 pozitivity je doporučena imunohistochemie jako screeningové vyšetření, následované *in situ* hybridizací u hraničních IHC2+ případů.⁴

BREAST CANCER 1/2

BRCA1 a *BRCA2* (breast cancer 1/2) tumor supresorové geny, lokalizovány na chromosomech 17q21 a 13q12, hrají nepostradatelnou roli při udržování stability DNA a opravě dvouvláknových zlomů v DNA pomocí homologní

Tab. 1 Molekulární charakterizace jednotlivých subtypů karcinomu prsu

Molekulární subtyp	Zástupný podtyp	ER		PR	HER2	Ki-67
luminální A	luminální A-like	+	a/nebo	+	-	< 14 %
luminální B	luminální B-like, HER2-negativní	+	a/nebo	+	-	≥ 14 %
	luminální B-like, HER2-pozitivní	+	a/nebo	+	+	není stanoveno
HER2-pozitivní	HER2-pozitivní	-		-	+	není stanoveno
bazální	triple negativní	-		-	-	není stanoveno

ER – estrogenový receptor; PR – progesteronový receptor; HER2 – receptor pro epidermální růstový faktor 2

Zdroj: archiv autorů

Tab. 2 Rutinně používané biomarkery a režimy cílené léčby

Biomarker	Testování	Aberace	Léčivo	Mechanismus účinku	Typ nádoru	Režim	Linie léčby
ER/PR	IHC	exprese	tamoxifen	ER modulátor	premenopauzální, postmenopauzální	neoadjuvantní, adjuvantní, paliativní	první, druhá
			toremifen	ER modulátor	postmenopauzální	adjuvantní, paliativní	první, druhá
			fulvestrant	selektivní degradace ER	postmenopauzální	paliativní	další linie
			anastrozol	inhibitor aromatázy	postmenopauzální	neoadjuvantní, adjuvantní, paliativní	druhá
			letrozol	inhibitor aromatázy	postmenopauzální	neoadjuvantní, adjuvantní, paliativní	druhá
			exemestan	inhibitor aromatázy	postmenopauzální	neoadjuvantní, adjuvantní, paliativní	druhá
			leuprolid	LH-RH analog	premenopauzální	adjuvantní, paliativní	druhá
			goserelin	LH-RH analog	premenopauzální	adjuvantní, paliativní	první, druhá
HER2	IHC, FISH	amplifikace overexprese	trastuzumab	MoAb proti HER2	–	neoadjuvantní, adjuvantní, paliativní	první
			ado-trastuzumab emtasin	MoAb proti HER2 + mikrotubulární inhibitor	–	adjuvantní, paliativní	druhá
			pertuzumab	MoAb proti HER2	–	neoadjuvantní, paliativní	první
			lapatinib	reverzibilní pan-HER TKI	postmenopauzální	paliativní	druhá
			neratinib maleat	ireverzibilní pan-HER TKI	–	adjuvantní	druhá
ER/PR+, HER2–	IHC	overexprese	ribociclib	CDK4/6 inhibitor	premenopauzální/ postmenopauzální	paliativní	druhá
			abemaciclib	CDK4/6 inhibitor	–	paliativní	druhá
			palbociclib	CDK4/6 inhibitor	postmenopauzální	paliativní	druhá
mTOR*	IHC	overexprese	everolimus	mTOR inhibitor	postmenopauzální, rekurentní	paliativní	druhá
BRCA1/2	PCR, NGS	gBRCA mutace	olaparib	PARP1 inhibitor	–	paliativní	další linie
AR*	IHC	exprese	abirateron acetat	AR inhibitor	postmenopauzální	klínické testování	–
			orteronel	AR inhibitor	–	klínické testování	–
			4-OH-testosteron	agonista AR	–	klínické testování	–
			enobosarm	selektivní AR modulátor	postmenopauzální	klínické testování	–
			bicalutamid + inhibitor aromatázy	kombinace	–	klínické testování	–

ER – estrogenový receptor; PR – progesteronový receptor; HER2 – receptor pro epidermální růstový faktor 2; AR – androgenový receptor
 IHC – imunohistochemie; PCR – polymerázová řetězová reakce; FISH – fluorescenční in situ hybridizace; NGS – next-genomové sekvenování;
 TKI – tyrozinkinázový inhibitor; MoAb – monoklonální protilátka; CDK – cyklin-dependentní kináza; PARP – poly(ADP-ribóza) polymeráza
 * mTOR exprese se netestuje, indikováno na základě ER/PR positivity; * v klinickém testování, exprese se v rutinní diagnostice netestuje

Zdroj: archiv autorů

rekombinace. Mutace v genech *BRCA* vedou k chybám v těchto reparačních mechanismech, tím ke genomické nestabilitě a kumulaci genových alterací. Populační četnost zárodečných mutací *BRCA1/2* se pohybuje mezi 1 : 400 a 1 : 800. Pacienti se zárodečnými mutacemi v genech *BRCA1* a *BRCA2* mají vyšší riziko vzniku nádoru prsu (50–70 %), vaječníků (15–55 %) a dalších malignit, jako jsou například nádory prostaty, pankreatu, tlustého střeva, slinivky a žaludku.⁵ *BRCA1/2* mutace jsou popsány u 5–10 % případů karcinomu prsu (velmi často se jedná o triple-negativní karcinomy prsu) a u 15 % nádorů vaječníků.^{6,7}

BRCA-mutované buňky využívají pro opravu DNA jiných mechanismů. Jedním z nich je poly(ADP-ribóza) polymeráza (PARP), která hraje důležitou roli v bazové excizní reparaci a reparaci dvouvláknových DNA zlomů. Inhibicí PARP tak dochází k nárůstu neopravených toxických dvouvláknových zlomů DNA a následně k buněčné smrti podle principu syntetické letality. Inhibitory PARP olaparib a rucaparib byly ve Spojených státech amerických i v Evropě schváleny pro léčbu dříve léčeného pokročilého karcinomu vaječníků s germinální mutací *BRCA1/2*.⁶ V lednu 2018 byl olaparib schválen FDA jako první inhibitor PARP pro léčbu HER2-negativního pokročilého karcinomu prsu s mutací *BRCA1/2*. Slibně vypadají i výsledky dalšího inhibitoru PARP talazoparibu, jehož účinnost je testována v řadě klinických studií.

TOPOIZOMERÁZA II A

Gen *TOP2A* (topoizomeráza II a), lokalizovaný na 17q21, kóduje esenciální enzym topoizomerázu II alfa, který zajišťuje štěpení a rekombinaci dvouvláknové DNA při replikaci, transkripci, kondenzaci a segregaci chromatid.⁸ Lidská topoizomeráza II se vyskytuje ve dvou vysoce homologních izoformách – izoformě α (170 kDa) a β (180 kDa). *TOP2A* je exprimován v proliferujících buňkách v pozdní S a G2-M fázi a jeho nadměrná exprese nebo amplifikace je negativním prognostickým faktorem u velkého počtu malignit včetně karcinomu prsu, obzvláště subtypu luminal B.⁹

TOP2A gen bývá u karcinomu prsu velmi často koamplifikován s *HER2*, až 50 % *HER2*-pozitivních nádorů prsu je zároveň *TOP2A* amplifikovaných.¹⁰ Zvýšené množství topoizomerázy II

v nádorových buňkách je cílem pro topoizomerázové inhibitory. Pro léčbu karcinomu prsu jsou v neoadjuvantním, adjuvantním i paliativním režimu schváleny antracykliny (doxorubicin), které inhibují topoizomerázu II ve fázi štěpení DNA, stabilizují tak zlomy v DNA, dochází k zastavení replikace a indukci apoptózy. Kromě přímé inhibice topoizomerázy II, antracykliny rovněž interkalují do DNA. Amplifikace *TOP2A* je považována za prediktivní marker pro účinnost antracyklinové terapie, některé studie však prediktivní hodnotu zpochybňují.¹¹ V současné době jsou léčebné režimy, zahrnující antracykliny, indukovány bez ohledu na přítomnost *TOP2A*-pozitivity. Velkým problémem antracyklinové terapie zůstává její kardiotoxicita, která je často limitujícím faktorem léčby.

KI-67

Nukleární protein Ki-67, kódovaný genem *MKI67* (10q26,2), je nepostradatelný pro buněčnou proliferaci a transkripci ribozomální RNA (ribonukleové kyseliny). Vzhledem k tomu, že je Ki-67 exprimován během celého buněčného cyklu vyjma G0 fáze a jeho exprese významně stoupá během S fáze, je exprese Ki-67 používána jako marker proliferace. Exprese Ki-67 bývá v klinické praxi stanovena imunohistochemicky pomocí monoklonální protilátky MITB-1.

Nádory s vyšší proliferací aktivitou mají obecně horší prognózu, vyšší grade a riziko relapsu. U karcinomu prsu se vyšetření exprese markeru Ki-67 používá pro odlišení expresních profilů nádoru, k odlišení hormonálně-pozitivních subtypů luminal A (exprese Ki-67 < 14 %) a luminal B.¹² I přesto, že je exprese Ki-67 u karcinomu prsu jedním z hlavních negativních prognostických faktorů, vysoká exprese Ki-67 je prediktorem dobré odpovědi na chemoterapii i hormonální terapii v neoadjuvantním i adjuvantním režimu. V současné době je proto vyšetření exprese Ki-67 jedním z klíčových faktorů při volbě léčebného režimu.^{13,14}

TP53

Gen *TP53* je lokalizován na krátkém rameni chromosomu 17 (17p13.1), kóduje jaderný tumor supresorový protein p53, který má zásadní význam v kontrole buněčného cyklu, udržení DNA stability pomocí reparačních mechanismů, apoptóze a senescenci. Aberace v genu či proteinu p53 jsou nejčastějšími alteracemi

vyskytujícími se napříč různými typy nádorových onemocnění.

U karcinomu prsu, podobně jako u jiných typů nádorů, bývá mutace v *TP53* spojována s agresivním chováním, metastatickým potenciálem, progresí a horším přežitím. Vliv *TP53* mutací na přežití pacientů s karcinomem prsu byl však řadou studií vyvrácen, prognostický význam *TP53* mutací u karcinomu prsu proto zůstává kontroverzní. *TP53* mutace bývají spojeny se špatnou odpovědí na DNA-poškozující chemoterapii, například doxorubicin. Mutace *TP53* bývá nalezena přibližně u třetiny případů karcinomu prsu, nejčastěji se jedná o mutaci v DNA-vazebné doméně proteinu p53. *TP53* mutace jsou asociovány s ER-negativitou, tedy s bazálními a HER-pozitivními podtypy. U TNBC (triple-negative breast cancer, triple-negativní karcinom prsu) jsou mutace v genu *TP53* nejčastějšími mutacemi, vyskytujícími se u 65–80 % případů.¹⁵ V klinické praxi není status genu *TP53* vyšetřován.

ANDROGENNÍ RECEPTOR

Androgenní receptor (AR), kódovaný genem *AR* (Xq11-12), je ligandem-aktivovaný transkripční faktor. K aktivaci receptoru dochází vazbou androgenních hormonů (testosteron/ dihydrotestosteron) v cytoplasmě, po translokaci do jádra je spuštěna transkripce cílových genů (např. prostatického antigenu). Stanovení exprese AR je zásadní pro pacienty s karcinomem prostaty, nicméně exprese AR byla popsána přibližně u 70 % pacientek s karcinomem prsu. Pozitivita AR je silně asociována s ER/PR pozitivitou, exprese AR je nalezena u více než 90 % ER-pozitivních případů karcinomu prsu. AR-pozitivita je častější u starších žen a je asociována s nižším stadiem, velikostí tumoru, grade, zasažením uzlin, s nižším rizikem relapsu a lepším celkovým přežitím i přežitím bez známek nemoci.¹⁶ Přestože je AR dobrým prognostickým faktorem, je AR-pozitivita spojená s rezistencí na tamoxifen, poměr AR/ER > 2 je indikátorem špatné odpovědi na tamoxifen v adjuvantní terapii.¹⁷

I přes to, že je AR-pozitivita asociována s ER/PR-pozitivitou, bývá AR-pozitivita nalezena i u triple-negativních karcinomů prsu (u 13–37 % TNBC), u nichž je asociována se subtypem LAR (luminal androgen receptor), vyšším věkem,

dobrou prognózou, ale horší odpovědí na neoadjuvantní terapii. Vzhledem k četnosti AR pozitivity, jednoduchosti detekce a v onkologii již používané anti-AR terapii, je tento receptor u karcinomu prsu zajímavým cílem terapie. Z klinického hlediska je cílení AR nejdůležitější právě u TNBC, kde cílená terapie téměř chybí. AR-pozitivní TNBC navíc velmi často nesou rovněž *PIK3CA* mutaci, nabízí se tak i cílení tohoto biomarkeru, případně jejich kombinace. V probíhajících klinických studiích jsou momentálně u karcinomu prsu testovány AR inhibitory, agonisté, selektivní modulatory a jejich kombinace (tab. 2).

RECEPTOR PRO EPIDERMÁLNÍ RŮSTOVÝ FAKTOR

Receptor pro epidermální růstový faktor (*EGFR*) gen (7p11.2) kóduje transmembránový tyrozinkinázový receptor z HER (ErbB) rodiny (*EGFR*, *HER2*, *HER3*, *HER4*). Po vazbě ligandu dochází k tvorbě *EGFR* homo/heterodimerů a následně iniciaci signálních kaskád *PI3K/AKT*, *RAS/RAF/MEK/ERK*, *STAT* a *PLC/PKC* vedoucí k proliferaci, angiogenezi a vzniku metastáz. Nadměrná exprese genu *EGFR* bývá u karcinomu prsu nalezena až u 30 % případů.¹⁸ Nadměrná exprese *EGFR* a *HER3* je spojována se špatnou prognózou, naopak nadměrná exprese *HER4* je pravděpodobně dobrým prognostickým faktorem.¹⁹ Na rozdíl od *HER2*, kde je nadměrná exprese indukována převážně amplifikací genu, amplifikace *EGFR* se u karcinomu prsu vyskytuje pouze přibližně u 6 % případů.²⁰

Cílená léčba proti *EGFR* se rutinně používá u nemalobuněčného plicního karcinomu (non-small lung cancer, NSCLC), karcinomu slinivky břišní (tyrozinkinázové inhibitory) či kolorektálního karcinomu a nádorů hlavy a krku (monoklonální protilátky). U karcinomu prsu, i přes řadu klinických studií, významný léčebný efekt zatím nebyl jednoznačně prokázán. V současné době probíhá řada klinických studií objasňující účinek anti-*EGFR* terapií v různých režimech a kombinacích (clinicaltrials.gov). Pro léčbu *HER2*-pozitivního karcinomu prsu jsou schváleny multikinázové inhibitory lapatinib a neratinib, které vyjma *HER2* cílí i *EGFR* receptor. Slibné výsledky u karcinomu prsu ukázal i multikinázový inhibitor afatinib, který je již chválený pro léčbu NSCLC. Z monoklonálních

protilátek je pro léčbu karcinomu prsu schválený pertuzumab, který zabraňuje heterodimerizaci *HER2* s ostatními členy *HER* rodiny, včetně *EGFR*. Indikace anti-*HER* terapie je u karcinomu prsu prozatím omezena na *HER2*-pozitivní nádory.

DRÁHA PI3K/AKT/MTOR

Alterace v *PI3K/AKT/mTOR* signální dráze jsou pozorovány u různých typů nádorových onemocnění včetně karcinomu prsu.²¹ Tato signální dráha hraje klíčovou roli při přenosu mitogenního buněčného signálu a reguluje procesy jako buněčné přežití, proliferace a diferenciace.²² Fosfatidylinositol-3-kináza (*PI3K*) po aktivaci fosforyluje a aktivuje serin/threoninovou kinázu *AKT*, která dále aktivuje řadu proteinů jako *CREB* a *mTOR*. Až u 70 % případů karcinomu prsu byly nalezeny molekulární změny v *PI3K/Akt/mTOR* signální dráze. Nejčastěji se vyskytují mutace v genu *PIK3CA* (katalytická podjednotka *PI3K* alfa) a ztráta funkce nebo exprese *PTEN* (tumor supresor; negativní regulátor *PI3K* signalizace).²³

Zatímco jsou *PIK3CA* mutace asociované s ER-pozitivitou a nejčastěji se tak vyskytují u lumenálních a *HER2*-pozitivních podtypů, ztráta funkce *PTEN* je asociována s ER-negativitou, a vyskytuje se tak především u bazálního podtypu karcinomu prsu, respektive TNBC. Největší prevalence *PIK3CA* mutací u TNBC je u LAR podtypu, předběžné výsledky ukazují velmi dobrou odpověď na konkomitantní terapii *PI3K* a AR inhibitory. U ER-pozitivních nádorů je onkogenní aktivace *PI3K/AKT/mTOR* signální dráhy spojena s rezistencí na hormonální terapii, u *HER2*-pozitivních nádorů bývá spojena s rezistencí k anti-*HER2* terapii (trastuzumab, lapatinib). V současné době probíhá řada klinických studií, které cílí *PI3K/AKT/mTOR* signální dráhu (clinicaltrials.gov). U pokročilého, hormonálně pozitivního, *HER2*-negativního karcinomu prsu je v kombinaci s exemestanem schválen *mTOR* inhibitor everolimus. U *HER2*-pozitivních nádorů prsu je testován everolimus, temsirolimus a další *mTOR* inhibitory v různých léčebných kombinacích.²⁴ Nadějně vypadají i klinické studie hodnotící účinek *mTOR*, *PI3K*, *AKT* a *mTOR/PI3K* inhibitorů samotných či v kombinacích s dalšími terapeutiky u TNBC (například AR, PARP inhibitory).²⁵

PLATFORMY ZALOŽENÉ NA BIOMARKERECH

V současné době jsou na trhu multigenové testy, které odlišují níže a vysoce rizikový karcinom prsu na molekulární úrovni, a jsou tak schopny zařadit pacienta do jedné z podskupin, stanovit míru rizika či vhodnost terapie.

Mezi nejpoužívanější testy patří Oncotype DX, MammaPrint, PAM-50, Prosigna test, Endopredict, FEMTELE, Mammastrat a další. Klinicky nejrozšířenějším a nejvíce validovaným testem je Oncotype DX (Genomic Health, Inc.), který předpovídá riziko rekurence časných stadií karcinomu prsu na základě expresního profilu 21 genů (16 genů spojených s nádorovým onemocněním, pět kontrolních genů). Jedná se o geny spojené s proliferací, invazivitou, ER a *HER2* dráhou. Assay, založený na real-time RT-PCR, je proveditelná z RNA izolované z FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) vzorků. Oncotype DX byl primárně validován na vzorcích pacientek ze tří nezávislých studií, u kterých bylo hodnoceno riziko recidivy s více než desetiletým sledováním. U Oncotype DX je hodnoceno tzv. skóre rekurence (RS), na základě kterého lze nádor zařadit do jedné ze tří rizikových skupin. Bylo prokázáno, že hodnota RS je jak prognostický faktorem, tak i prediktorem odpovědi na chemoterapii. Na základě výsledků řady prospektivních i retrospektivních studií byl Oncotype DX assay zařazen do mezinárodních doporučení pro léčbu karcinomu prsu (ESMO, ASCO, St. Gallen, NCCN). Od roku 2014 je vyšetření zařazeno i do doporučení České onkologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně pro adjuvantní léčbu časného ER+, *HER*-karcinomu prsu grade 2. Toto vyšetření je u pacientek s nejednoznačným benefitem z chemoterapie hrazeno ze zdrojů zdravotního pojištění.

BUDOUCNOST BIOMARKERŮ

Markery jako ER, PR, *HER2*, Ki-67 a *BRCA1/2*, jejichž prediktivní význam byl prokázán řadou klinických studií, jsou v současné době nedílnou součástí rutinní diagnostiky, jejich testování má bezesporu zásadní vliv na volbu adekvátního terapeutického postupu a zkvalitnění života konkrétního pacienta.

Kromě klinicky validovaných biomarkerů bylo u karcinomu prsu nalezeno značné množství

dalších alterací, které se tak stávají potenciálními cíli pro protinádorovou terapii. Třetím nejčastějším mutovaným genem u karcinomu prsu je gen *PALB2*, který společně s *BRCA2* zajišťuje reparaci poškozené DNA. Až u 35 % žen se zárodečnou mutací *PALB2* dochází k rozvoji karcinomu prsu. Podobně zárodečné mutace tumor-supresorového genu *CHEK2* zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu až desetkrát. Z dalších častých mutací byly u karcinomu prsu nalezeny mutace *KRAS*, *APC*, *CDHI*, *ATM*, *CASP8*, *FGFR2*, *MAP3K1*, *RAD51* a další. Velký příslib v léčbě karcinomu

prsu slibuje i imunoterapie, která už se s úspěchem používá u nádorů plic.

Cílem personalizované medicíny je na základě molekulárně-genetické a/nebo proteomické charakteristiky nádoru nalézt robustní biomarker, který bude možné klinicky validovat a implementovat do diagnosticko-léčebné praxe. Nalezení klinicky relevantního nádorového biomarkeru je obtížné vzhledem k obrovské heterogenitě nádorové populace (obzvláště u TNBC), získané rezistenci na léčbu a vzniku sekundárních aberačí

způsobených léčbou. Zcela zásadní jsou dobře definované klinické studie s přísnými kritérii a logickými výstupy. Problémem klinických studií je často nejednotnost diagnostických metod, stanovení hraničních hodnot či limitující nedostatek biologického materiálu a klinických dat. I přes všechny limity, výzkum nádorových onemocnění za poslední dekádu přinesl nesmírný pokrok, který zachránil obrovské množství lidských životů.

Práce byla podpořena grantem NPU LO1304.

LITERATURA

- Carroll JS. Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer. *Eur J Endocrinol* 2016;175:R41–R49.
- Carroll JS, Hickey TE, Tarulli GA, et al. Deciphering the divergent roles of progesterone in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 2017;17:54–64.
- Spector NL, Blackwell KL. Understanding the Mechanisms Behind Trastuzumab Therapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5838–5847.
- Modrá kniha České Onkologické Společnosti. Dostupné na: www.lmkos.cz, 2018.
- Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, et al. Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005;353:229–237.
- Okuma HS, Yonemori K. BRCA Gene Mutations and Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol* 2017;1026:271–286.
- Neff RT, Senter L, Salani R. BRCA mutation in ovarian cancer: testing, implications and treatment considerations. *Ther Adv Med Oncol* 2017;9:519–531.
- Nitiss JL. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer* 2009;9:327–337.
- Vang Nielsen K, Ejlertsen B, Møller S, et al. The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: Update of DBCG trial 89D. *Acta Oncol* 2008;47:725–734.
- Fasching PA, Weibrecht S, Haeberle I, et al. HER2 and TOP2A amplification in a hospital-based cohort of breast cancer patients: associations with patient and tumor characteristics. *Breast Cancer Res Treat* 2014;145:193–203.
- Press MF, Sauter G, Buysse M, et al. Alteration of topoisomerase II- α in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2011;29:859–867.
- Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies – improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 2015;26:1533–1546.
- Ingolf J-B, Russalina M, Simona M, et al. Can Ki-67 Play a Role in Prediction of Breast Cancer Patients' Response to Neoadjuvant Chemotherapy? *Biomed Res Int* 2014;2014:1–7.
- Penault-Llorca F, André F, Sagan C, et al. Ki67 Expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:2809–2815.
- Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 2017;8:8921–8946.
- Bozovic-Spasojevic I, Zardavas D, Brohée S, et al. The prognostic role of androgen receptor in patients with early-stage breast cancer: a meta-analysis of clinical and gene expression data. *Clin Cancer Res* 2017;23:2702–2712.
- Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res* 2014;16:R7.
- Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, et al. Expression of the HER1–4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 2003;200:290–297.
- Wang J, Yin J, Yang Q, et al. Human epidermal growth factor receptor 4 (HER4) is a favorable prognostic marker of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2016;7:76693–76703.
- Cho EY, Choi Y-L, Han JJ, et al. Expression and amplification of Her2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer: Immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Pathol Int* 2007;58:17–25.
- Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2007;12:395–402.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:627–644.
- López-Knowles E, O'Toole SA, McNeil CM, et al. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer* 2010;126:1121–1131.
- Baselga J, Cortés J, Im S-A, et al. Biomarker analyses in CLEOPATRA: A phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human epidermal growth factor receptor 2–positive, first-line metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2014;32:3753–3761.
- Costa RL, Han HS, Gradishar WJ. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat* 2018;169:397–406.