

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně citovat.

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Genetika, molekulární biologie a virologie

Studijní obor: N-GEMOEU



Bc. Jana Limbergová

Vývoj genetických a epigenetických změn u nemocných s recidivujícími mozgovými gliomy

The development of genetic and epigenetic aberrations in patients  
with recurrent cerebral gliomas

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Praha, 2024

Charles University

Faculty of Science

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2.8.2024

Podpis

---

Na tomto místě bych ráda vyjádřila svůj upřímný dík vedoucí diplomové práce, doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc., a mé konzultantce, RNDr. Libuši Lizcové, za jejich odborné znalosti, neochvějnou podporu, zasvěcené vedení a povzbuzení během mé výzkumné cesty. Jsem také hluboce vděčná všem v laboratoři Centra nádorové cytogenomiky Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK za jejich práci, přátelství a vytvoření prostředí pro spolupráci, což z tohoto udělalo skutečně obohacující zážitek. Vaše společné příspěvky a pomoc byly rozhodující pro provedení této práce. Děkuji také za zajištění finanční podpory díky výzkumnému grantu RVO-VFN64165. V neposlední řadě velký dík patří také mé rodině, partnerovi a přátelům za jejich nekončící podporu, bez které by zhotovení této práce bylo velmi obtížné.

## Abstrakt

Mozkové gliomy jsou heterogenní skupina nádorů různých histologických subtypů, které se liší maligním potenciálem, odpovědí na léčbu a celkovým přežitím nemocných. Jejich difúzní charakter neumožňuje kompletní chirurgické odstranění, a proto dochází k malignímu zvratu či k recidivě tumoru. Nedávné studie recidivujících gliomů poukázaly na kumulaci dalších genetických a epigenetických aberací, jejichž povaha, frekvence a úloha v patogenezi nádoru zatím není dostatečně prostudována. V této studii bylo využito molekulárně cytogenomických metod (aCGH/SNP, I-FISH a MLPA) pro porovnání genetických profilů primárních a recidivujících gliomů u 26 nemocných s vícečetnými resekcemi v průběhu onemocnění. Zvláště byly analyzovány tři skupiny dle subtypu nádoru při diagnóze – astrocytomy, oligodendrogliomy a primární glioblastomy. Diplomová práce předložila porovnání genomových profilů diagnostických vzorků a vzorků z opakovaných odběrů pro každou ze tří skupin. Pro nejpočetnější skupinu – nemocní s astrocytomy – byly charakterizovány kandidátní aberace s potenciálním vztahem k progresi onemocnění. Patřily mezi ně zisky a ztráty na chromozomech 5, 9, 11, 13, 15, 16 a 22. Díky získaným datům byla provedena analýza klonálního vývoje. Lineární typ evoluce byl primárním typem evoluce v oligodendrogliomech. Astrocytomy a primární glioblastomy dominovaly divergentní evolucí nádorových subklonů. Sledování klonálního vývoje difúzních gliomů při jejich progresi je důležité pro lepší pochopení patogeneze a maligního vývoje těchto nádorů. Určení aberací spojených s progresí nádoru by mohlo přispět k vývoji cílené léčby.

**Klíčová slova:** difúzní gliomy, astrocytom, oligodendrogliom, primární glioblastom, genetické aberace, epigenetické aberace, progresse tumoru

## **Abstract**

Cerebral gliomas are a heterogeneous group of tumours of different histological subtypes, which differ in malignant potential, response to treatment and overall survival of patients. Their diffuse nature does not allow for complete surgical removal and therefore malignant relapse, or tumour recurrence occurs. Recent studies of recurrent gliomas have highlighted the accumulation of other genetic and epigenetic aberrations whose nature, frequency and role in tumour pathogenesis have not yet been sufficiently studied. In this study, molecular cytogenomic methods (aCGH/SNP, I-FISH and MLPA) were used to compare the genetic profiles of primary and recurrent gliomas in 26 patients with multiple resections during the course of the disease. Three groups were analysed according to tumour subtype at diagnosis: astrocytomas, oligodendrogliomas, and primary glioblastomas. The thesis presented a comparison of the genomic profiles of diagnostic and repeat samples for each of the three groups. Candidate aberrations with a potential relationship to disease progression were characterized for the largest group - patients with astrocytomas. These included gains and losses on chromosomes 5, 9, 11, 13, 15, 16 and 22. With the data obtained, a clonal evolution analysis was performed. Linear type of evolution was the primary type of evolution in oligodendrogliomas. Astrocytomas and primary glioblastomas were dominated by divergent evolution of tumour subclones. Monitoring the clonal development of diffuse gliomas as they progress is important for a better understanding of the pathogenesis and malignant development of these tumours. Identification of aberrations associated with tumour progression could contribute to the development of targeted therapies.

**Keywords:** diffuse glioma, astrocytoma, oligodendroglioma, primary glioblastoma, genetic aberrations, epigenetic aberrations, tumour progression

# Obsah

1. Úvod .....	9
2. Přehled literatury .....	10
Stratifikace gliomů .....	10
Oligodendrogliomy.....	13
Astrocytomy .....	15
Glioblastomy .....	16
3. Genetické změny u mozkových gliomů .....	18
Kodelece 1p/19q.....	19
Amplifikace genu <i>EGFR</i> .....	20
Delece genu <i>PTEN</i> .....	21
Delece lokusu <i>CDKN2A/B</i> .....	23
Mutace <i>IDH</i> genu .....	23
Mutace genu <i>ATRX</i> .....	27
Mutace promotoru genu <i>TERT</i> .....	28
Epigenetické změny.....	29
4. Klonální vývoj .....	30
5. Léčba .....	34
6. Cíle .....	35
7. Materiál.....	36
Soubor pacientů .....	36
Chemikálie a roztoky.....	37
8. Metody.....	39
Zpracování mozkové nádorové tkáně.....	39
Zpracování periferní krve .....	40
Izolace DNA z periferní krve .....	40
9. Výsledky.....	53
Výsledky I-FISH .....	56
Souhrnné výsledky a analýza klonálního vývoje .....	65
Astrocytomy .....	67
Oligodendrogliomy.....	72
Primární glioblastomy .....	76

10.	Diskuze .....	79
11.	Souhrn.....	88
12.	Seznam použité literatury .....	89
13.	Příloha diplomové práce.....	100 (i)



## Seznam zkratek

2HG	R(-)-2-hydroxyglutarát
<i>ABL1</i>	gen pro nереceptorovou tyrozin kinázu ABL
aCGH/SNP	mikročipová celogenomová hybridizace s analýzou polymorfizmů
$\alpha$ KG	$\alpha$ -ketoglutarát
Akt	Akt kináza
ALT	alternativní mechanismus prodlužování telomer
AMPK	proteinová kináza aktivovaná adenosin-monofosfátem
<i>ANXA7</i>	gen pro anexin A7
ATP	adenosin trifosfát
<i>ATRX</i>	alpha-thalassemia/mental retardation X-linked
CBTRUS	the Central Brain Tumor Registry of the United States
<i>CCND1</i>	gen pro cyklin D1
<i>CDK6</i>	gen pro cyklin-dependentní kinázu 6
<i>CDKL3</i>	kináza podobná cyklin dependentní kináze 3
<i>CDKN2A/B</i>	gen pro dva sestřihové transkripty inhibitoru cyklin-dependentní kinázy
<i>CIC</i>	gen pro homolog drosofilího genu <i>capicua</i>
cIMPACT-NOW	Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – Not Official WHO
CNC	Centrum nádorové cytogenomiky Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze
CNS	centrální nervová soustava
CNV	změny v počtu kopií
CpG	cytosin-fosfát-guanin dinukleotidy
<i>CTNNA1</i>	gen pro katenin alfa 1
dH <sub>2</sub> O	redestilovaná voda
ddH <sub>2</sub> O	dvojitě destilovaná voda
dNTP	dinukleotid trifosfát
dUTP	2'-deoxyuridin 5'-trifosfát
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
<i>EGFR</i>	gen pro epidermální růstový faktor
<i>EGFRvI - vV</i>	varianty genu <i>EGFR</i>
<i>EGR1</i>	gen pro early growth response protein 1
ErbB	rodina proteinů obsahující čtyři receptorové tyrozin kinázy
EtOH	ethanol
FAK	focal adhesion kináza
<i>FUBP1</i>	gen pro far upstream element vazebný protein
G-CIMP	gliomový metylační fenotyp CpG ostrůvků
GLS	glutamát-cystein ligáza
GSH	glutation
GSSG	glutation disulfid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HE	barvicí technika hematoxylin-eozinovým barvivem
HIF-1 $\alpha$	hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$
<i>IDH1</i> nebo <i>IDH2</i>	gen pro izocitrát dehydrogenázu 1 a 2
IRF3	interferonový regulační transkripční faktor
Jak/Stat3	JAK/STAT signalizační buněčná dráha
KCl	chlorid draselný
KDM4	lysin-sepcifická histon-demetyláza

LOH	ztráta heterozygotnosti
LSI	lokus specifické
MDM2	protein mouse double minute 2
<i>MET</i>	gen pro epitelo-mezenchymální tranziční faktor
<i>MLH3</i>	gen pro MutL homolog 3
MMR	reparačního mechanismu mismatch repair
<i>MGMT</i>	gen pro O6-metylguanin-DNA-metyltransferázu
mTOR	protein mammalian target of rapamycin
MVP	mikrovaskulární proliferace
<i>MYC</i>	gen pro lidský protoonkogen <i>MYC</i>
NADP <sup>+</sup> /H	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
<i>NOTCH1</i>	gen pro neurogenický lokus notch homolog 1
NOR	Národní onkologický registr
Nrf2	transkripční faktor příbuzný jadernému erytroidnímu faktoru 2
PBS	fosfátový pufr
<i>PDGFRA</i>	gen pro receptor destičkového růstového faktoru alfa
PHD	prolylhydroxyláza
Pi3k	fosfatidylinozitol-3-kináza
PIP3	fosfatidylinozitol-3,4,5-trifosfát
PLC $\gamma$	$\gamma$ podjednotka fosfolipázy C
<i>pMGMT</i>	promotor genu <i>MGMT</i>
pRB	protein retinoblastomu
<i>PTEN</i>	gen pro homolog fosfatázy a tenzinu
<i>pTERT</i>	promotor genu <i>TERT</i>
<i>RAD51</i>	gen pro rekombinázu RAD51
Ras/Raf/Mek/Erk	signalizační dráha zahrnující proteiny, které přenášejí signál z receptoru na povrchu buňky do jádra
RE	restrikční pufr
ROS	reaktivní formy kyslíku
<i>RPS14</i>	gen pro ribozomální protein S14
SH2	doména Src homology 2
Shc	proteiny Src homology 2 domain-containing
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SSC	fyzilogický sodný roztok
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TAMs	makrofágy asociované s nádory
TBK1	protein TANK-vazebná kináza
TE	tris-EDTA pufr
<i>TERT</i>	gen pro katalytickou podjednotku telomerázy
TET	rodina enzymů ten-eleven translocation
TKR	tyrozin kinázy
TMZ	temozolomid
<i>TP53</i>	gen kódující protein p53
UPD	uniparentální dizomie
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
WHO	Světová zdravotnická organizace
WHO CNS5	páté vydání klasifikace nádorů CNS Světové zdravotnické organizace
wt	wildtype

# 1. Úvod

Gliomy jsou mozkové nádory odvozené z astrocytů, oligodendrocytů a jejich prekurzorů, jejichž incidence se pohybuje mezi 4 - 5 případy na 100 000 obyvatel. Jsou nejčastějšími primárními nádory centrální nervové soustavy (CNS) u lidí, představující 81 % všech zhoubných mozkových nádorů (Ostrom et al. 2014). Vznikají neoplastickou transformací gliálních buněk a vyznačují se svou vysokou proliferací a invazivitou (Lakomý, Kazda, a Šlampa 2018). Jedná se o heterogenní skupinu nádorů různých histologických subtypů. Liší se maligním potenciálem, odpovědí na léčbu a celkovým přežitím nemocných.

Klasifikace nádorů CNS je publikována Světovou zdravotnickou organizací (WHO). Páté vydání WHO klasifikace z roku 2021 přineslo velké změny, které ukotvují význam molekulární diagnostiky. Vznikla tak potřeba integrované diagnostiky spojující histologickou a molekulárně cytogenetickou analýzu. Rozlišuje nádory dospělých do tří typů – astrocytomy, oligodendrogliomy a glioblastomy. Každý typ je charakterizován morfologickými a také genetickými a epigenetickými znaky určující stupeň (grade) malignity (Louis et al. 2021).

Difúzní gliomy u dospělých tvoří sice pouhé 2 % všech nově diagnostikovaných nádorových onemocnění, nicméně jsou asociovány s vysokou mortalitou a morbiditou (Molinaro et al. 2019). Přes velké pokroky v diagnostice a léčbě dochází často k recidivám, které jsou asociovány se špatnou prognózou. Vzhledem k difúznímu charakteru růstu gliomů se nedaří chirurgicky odstranit všechny gliomové buňky. To vede ke vzniku rekurentních lézí a progresi onemocnění. Nedávné studie potvrdily přítomnost rozdílných subklonálních genetických a epigenetických změn mezi primárními a recidivujícími nádory (Johnson et al. 2014; J. Kim et al. 2015; Mazor et al. 2015). Proto je velmi důležité sledovat genetickou výbavu recidivujících gliomů a studovat genetické a epigenetické změny, což přispěje k lepšímu pochopení patogeneze onemocnění.

## 2. Přehled literatury

Difúzní gliomy jsou nejčastější tumory CNS dospělých (Ostrom et al. 2014). V České republice roční je jejich roční incidence okolo 7 až 8 případů na 100 000. Mortalita je vysoká a přežití pacientů podle Národního onkologického registru výrazně klesá během prvního roku od stanovení diagnózy (Lakomý et al. 2018). K tomu přispívá rychlost expanze tumoru, která se průměrně uvádí na 3,5 – 4,9 mm/rok pro gliomy druhého stupně (Pallud et al. 2010). Průměrná doba přežití nejagresivnějšího typu gliomu (glioblastom, grade 4) dosahuje pouhých 14,6 měsíců od prvotní diagnózy (Bao et al. 2021).

Jelikož se gliomy mohou vznikat jak z astrocytů, tak z oligodendrocytů, je nutné tyto subtypy odlišovat vzhledem k jejich významně odlišné odpovědi na léčbu (Zemanová et al. 2006). V posledních třiceti letech se objevily cytogenetické a molekulární studie, které identifikovaly základní genetické aberace vznikající během tumorigeneze a progresu gliomů a pomohly tak vytvořit přesnější klasifikaci. Mezi klinicky nejvýznamnější aberace se řadí chromozomové delece, aberantně aktivované buněčné signální dráhy nebo ztráty tumor supresorových genů. Kombinace specifických genetických aberací charakterizují subtypy difúzních gliomů a předurčují tak prognózu pacienta (Zemanová et al. 2006).

Většina případů gliomů u dospělých vzniká sporadicky, nicméně existují vzácné familiární nádorové syndromy spojené s gliomogenezí. Řadí se mezi ně například neurofibromatóza I. typu, Turcotův syndrom, Li-Fraumeniho syndrom, Lynchův syndrom a další (Rice et al. 2016). Syndromy jsou nejčastěji charakterizovány mutacemi se ztrátou funkce (tzv. loss-of-function) u tumor-supresorových genů. Ty mohou vznikat *de novo* anebo mohou být děděny s autosomálně recesivní nebo dominantní dědičností (Ostrom et al. 2019). U 5–10% pacientů se sporadickými gliomy byla prokázána rodinná historie mozkových nádorů. Nejbližší příbuzní pacientů s gliomy tak mají dvakrát vyšší riziko vývoje primárního mozkového nádoru (Molinaro et al. 2019). Ionizační záření je zatím jediným dobře validovaným rizikovým faktorem pro vývoj gliomů (Ostrom et al. 2019).

### **Stratifikace gliomů**

Standardní postup pro stanovení diagnózy primárních nádorů CNS nevyužívá tradiční TNM systém klasifikace a tradičně je založen na histologických znacích. Přítomnost rekurentních

chromozomových aberací nicméně naznačuje jejich významnou roli v klasifikaci difúzních gliomů. To je hlavní důvod pro zavedení genetických parametrů jako významných ukazatelů pro grading a stanovení prognózy onemocnění (Louis et al. 2021).

Podle Louis et al. (2021), poslední vydání klasifikace nádorů CNS Světové zdravotnické organizace (WHO CNS5) rozlišuje tři typy difúzních gliomů u dospělých, jak ukazuje **Tab. 1**. Prognostické skupiny jsou definovány dle nálezů rekurentních aberací: astrocytom, *IDH*-mutovaný; oligodendrogliom, *IDH*-mutovaný s kombinovanou delecí 1p/19q a glioblastom, *IDH*-wildtype. Toto rozdělení značně zjednodušilo dříve používanou klasifikaci (verze z roku 2016), kde byly tyto nádory rozděleny do patnácti skupin (Louis et al. 2016).

Název typu	CNS WHO Grade
Astrocytom, <i>IDH</i> -mutantní	2, 3, 4
Oligodendrogliom, <i>IDH</i> -mutantní s kodelecí 1p/19q	2,3
Glioblastom, <i>IDH</i> -wildtype	4

**Tabulka 1:** CNS WHO grading typů difúzních gliomů dospělých. Převzato z Louis et al. (2021)

Grading neboli stupňování gliomů je důležitý prognostický a prediktivní údaj, který určuje diferencovanost (vyzrállost) nádoru (Petruželka a Konopásek 2003) a představuje nástroj predikce chování nádoru (Lakomý et al. 2018). Gliomy mohou mít přiřazen grade (stupeň) 1 až 4. Gliomy prvního stupně jsou považovány za nádory benigní, jelikož je možné jejich kompletní chirurgické odstranění. V minulých vydání klasifikací CNS byly k označení stupně malignity užívány římské číslice (I–IV), WHO CNS5 naopak preferuje užívání arabských číslic z důvodu nebezpečí záměny při formálním písemném vyjadřování. Neodhalená topografická chyba by mohla nést významné klinické následky (Louis et al. 2021).

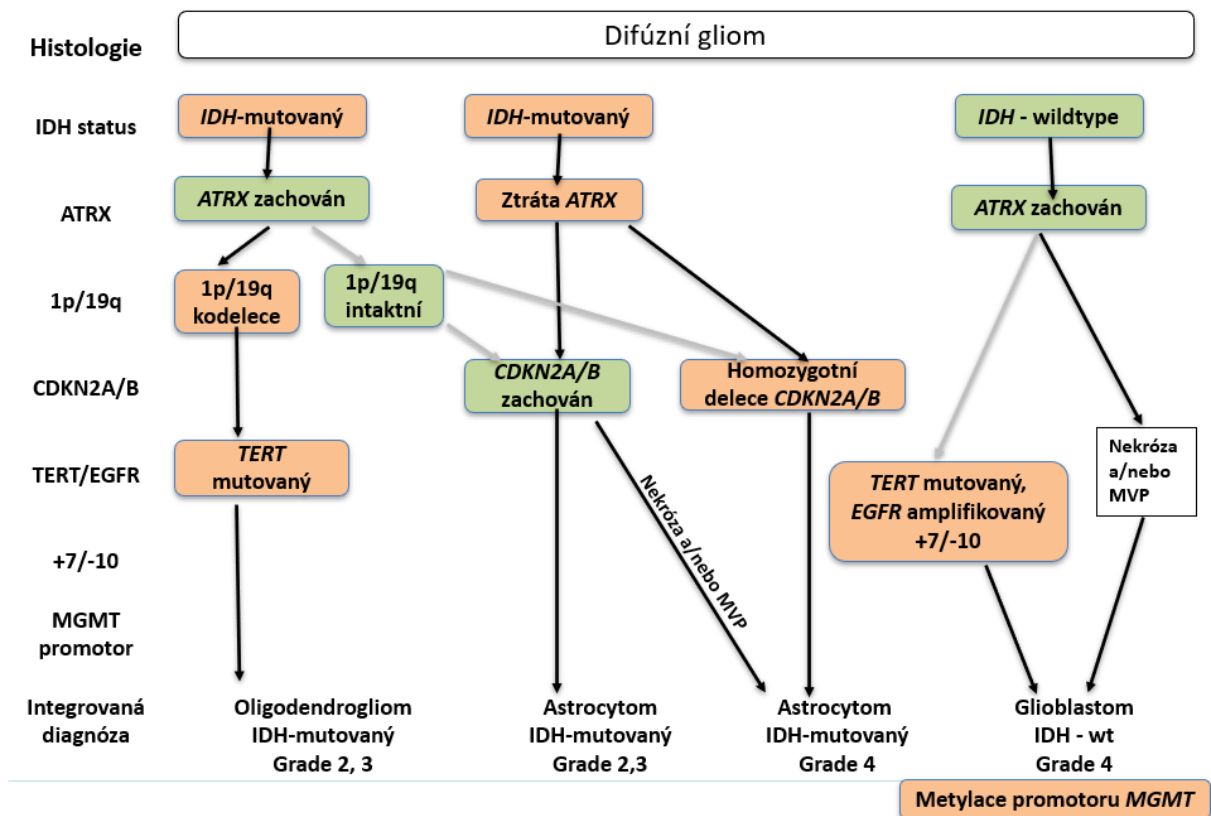
Určení stupně nádoru provádí histologicko-patologická laboratoř na parafinových řezech z resekci mozkové tkáně pomocí barvicí techniky hematoxylin-eozinovým barvivem (HE). Odborníci při určování stupně difúzních gliomů vychází z informací o:

- celularitě tkáně,
- přítomnosti nukleární atypie, tzn. tvarové a velikostní variability buněk či jader, hyperchromazie jader (jádra vypadají tmavší než obvykle po barvení HE),
- anaplazii neboli ztrátě diferenciaci,
- přítomnosti mikrovaskulárních proliferátů a nekróz

- a signifikantní mitotické aktivitě.

Difúzní gliomy druhého stupně (G2) se vyznačují cytonukleární atypií v tkáni nádoru. Přítomnost hypercelularity, anaplazie a mitotické aktivity je typická pro gliomy třetího stupně (G3) a léze čtvrtého stupně (G4) současně vykazují nekrózu a/nebo mikrovaskulární proliferáty (Lakomý et al. 2018). Histologicko-patologická pracoviště dokáží vyšetřit také molekulární alterace pomocí imunohistochemické detekce. Touto metodou lze detekovat například bodovou mutaci genu pro izocitrát dehydrogenázu *IDH1* (R182H) či ztrátu jaderné exprese genu *ATRX*.

Ze značné heterogenity morfologicky obdobných nádorů vychází nutnost komplexní diagnostiky (Lakomý et al. 2018). Koncept integrované diagnostiky byl zaveden již v minulém vydání WHO klasifikace. WHO CNS5 tento koncept rozšířila a prohloubila důležitost začleňování molekulárních parametrů. Díky molekulárním parametrům se diagnóza stává přesnější, jelikož může změnit stupeň nádoru, který se histologicky jeví jako jiný, obvykle nižší stupeň (Jirásek et al. 2022). Diagnostický algoritmus ukazuje **Tab. 2**. Po chirurgické resekci nádoru je vzorek tkáně odeslán k histologickému a imunohistochemickému vyšetření. Poté následuje izolace DNA z tkáně a molekulární vyšetření biomarkerů, které umožňuje určení subtypu a stupně nádoru. Pro diagnózu glioblastomu čtvrtého stupně stačí následující ukazatele: tkáň se histologicky podobá glioblastomu (znaky nekrózy a mikrovaskulární proliferace), faktor *ATRX* je přítomen a gen *IDH1* nevykazuje bodovou mutaci. Ve všech ostatních případech, kdy imunohistochemie neprokáže základní bodovou mutaci genu *IDH1*, je doporučeno provádět vyšetření mutací jinými metodami. V případě, že nádor *IDH1*-wildtype nevykazuje histologické známky glioblastomu, je doporučeno vyšetření základních molekulárních charakteristik glioblastomu: amplifikace genu *EGFR*, mutace promotoru genu *TERT*, trizomie chromozomu 7 a monozomie chromozomu 10. Dalšími důležitými markery pro kategorizaci difúzních gliomů jsou homozygotní delece *CDK2NA/B* lokusu, kodelece krátkého ramena chromozomu 1 a dlouhého ramena chromozomu 19 (kodelece 1p/19q) a stav metylace promotoru genu *MGMT* (Weller et al. 2021). Všem základním biomarkerům se bude práce věnovat podrobněji v následujících kapitolách.

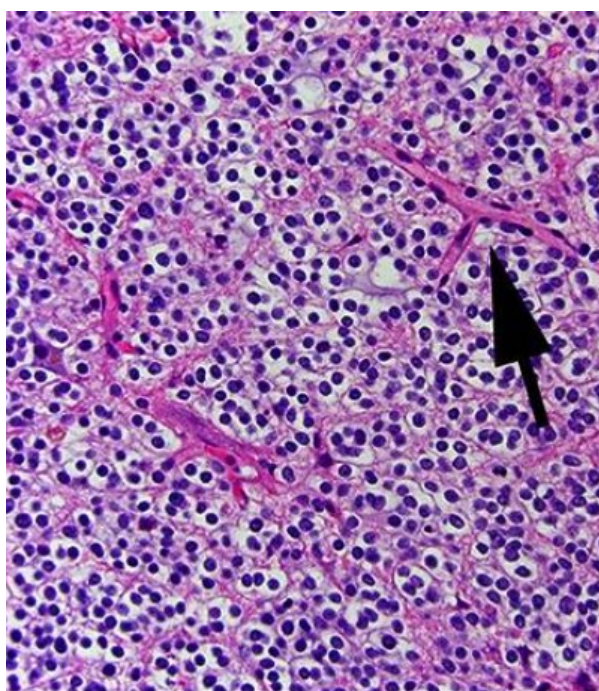


**Tabulka 2:** Schéma integrovaného postupu diagnózy difúzních gliomů. MVP = mikrovaskulární proliferace. Převzato a upraveno dle Weller et al. (2021).

## Oligodendrogliomy

Oligodendrogliomy jsou odvozeny z populací oligodendroglálních buněk a jsou to nejméně časté formy difúzních gliomů u dospělých. Dle recentní statistické studie zabývající se malignitami mozku diagnostikovanými mezi lety 2015 a 2019, kterou provedl registr nádorů mozku Spojených států amerických (The Central Brain Tumor Registry of the United States, CBTRUS), je v severoamerické populaci incidence oligodendrogliomů s 1p/19q kódelecí 0,29 na 100 000 obyvatel (Ostrom et al. 2022). Medián přežití nemocných s oligodendrogliomy je díky standardizované péči a lepší prognóze tohoto nádorového subtypu mezi 12 a 14 lety. Dříve či později dochází k maligní progresi do vyšších stupňů, což je pro pacienty vždy fatální (Wesseling et al. 2015). Japonský registr mozkových neoplázií uvádí jako prvotní symptomy asociované s oligodendrogliomy v 50% případů záchvaty, fokální symptomy v 17% případů a subjektivní symptomy, jako jsou bolesti hlavy, ve 23% případů (Brain Tumor Registry of Japan 2017).

Histologicky jsou oligodendrogliomy charakterizované kulatými jádry a jasnou cytoplazmou (Ichimura et al. 2015). Díky artefaktu způsobeném fixací tkáně ve formalinu se v perinukleární oblasti vytváří tzv. svatozáře (angl. perinuclear halo) neboli projasnění, které lze vidět na **Obr. 1**. Díky svým vlastnostem tvoří nádorová tkáň rovnoměrně rozprostřené buňky připomínající včelí plástve. Mezi další časté, ale nespecifické histologické znaky, se řadí shlukování buněk okolo těl neuronů a malých krevních cév pod měkkou mozkovou plenou (omozečnicí) na periferii tumoru, rozsáhlá kalcifikace a jemná síť větvičích se kapilár (Lakomý et al. 2018; Wesseling et al. 2015). Oligodendrogliomy mohou být charakterizovány stupni dva nebo tři. Pro třetí stupeň je potřeba, aby nádorové buňky obsahovaly mutace v genu *IDH* a zároveň kódelecí 1p/19q. Dále musí tkáň vykazovat endoteliální proliferaci, zvýšenou mitotickou aktivitu a nekrózu (Bent et al. 2017).



**Obrázek 1: Rovnoměrně rozprostřené buňky oligodendrogliomu připomínající včelí plástev.** Nádorové buňky mají kulatá jádra a projasnění připomínající volské oko. Šipka ukazuje větvičí se kapiláry. Zvětšení x200, barveno hematoxylinem. Převzato z Wesseling et al. (2015).

Primárním molekulárním znakem je delece jak krátkého ramena chromozomu 1, tak dlouhého ramena chromozomu 19 (kodelece 1p/19q). Dalšími typickými změnami je metylace promotoru genu pro O6-metylaguanin-DNA-metyltransferázy (*MGMT*) a mutace v genech pro izocitrát dehydrogenázu *IDH1* a 2, telomerázu (*TERT*) a pro regulátor transkripce *ATRX*. U nemocných s oligodendrogliomy a kodelecí 1p/19q bylo popsáno i několik dalších genových mutací. Mezi

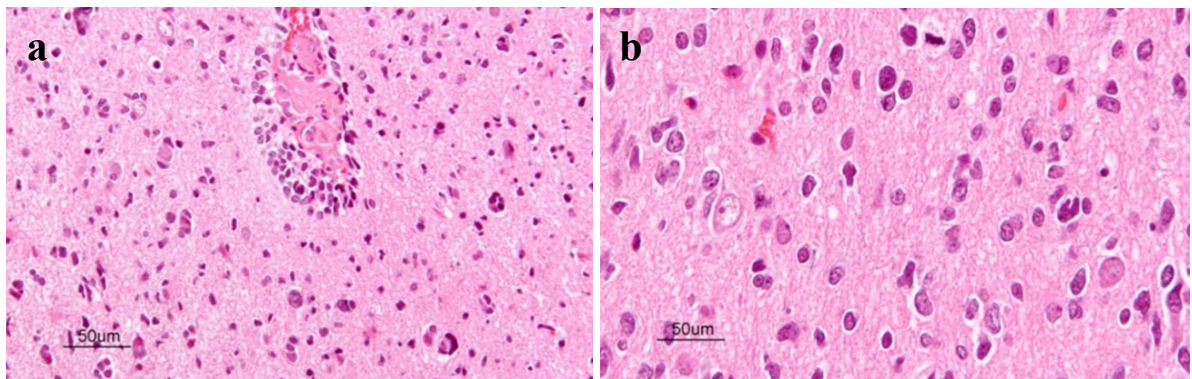


ně se řadí geny *CIC*, *NOTCH1* a *FUBP1* (Louis et al. 2021). Mutace v *CIC* a *FUBP1* způsobí produkci inaktivních proteinů. Homolog drosofilního genu *capicua* (*CIC*) leží na dlouhém raménku 19q a exprimovaný protein je zapojen do signalizace tyrozin kinázových receptorů. Gen *FUBP1* („far upstream element“ vazebný protein) je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 1. Protein FUBP1 se váže na jednořetězcovou DNA známého onkogenu *MYC* a absence jeho aktivity vede k aktivaci onkogenu (Bettegowda et al. 2011). Notch protein kódovaný genem *NOTCH1* je receptor zapojený do konzervované signální dráhy často asociované s maligní transformací (Bray 2006). V gliomech vyšších stupňů je zvýšená exprese tohoto proteinu (Yi et al. 2019).

## Astrocytomy

Astrocytární nádory jsou společně s glioblastomy nejčastějšími mozkovými nádory u dospělých jedinců čítající až 78 % všech gliomů (Ostrom et al. 2022). Primárně se vyskytují u mladých dospělých. Průměrný věk pacientů s diagnostikovanými astrocytomy je 36 let. Difúzně infiltrující astrocytomy se dají považovat za fatální maligní neoplázie nezávisle na stupni malignity vzhledem k nevyhnutelné recidivě a maligní progresi do vyšších stupňů včetně glioblastomu. Nevyhnutelnost recidivy je způsobena nemožností kompletní chirurgické resekce (Ichimura et al. 2015). Mezi prvotní symptomy se pro astrocytomy uvádí záchvaty ve 40 % případů, intrakraniální tlak v 5 % případů a fokální symptomy ve 22 % případů (Brain Tumor Registry of Japan 2017).

Astrocytom se pod mikroskopem jeví jako hypercelulární oblast mozku či míchy smíšené s nádorovými buňkami, které dále tvoří sekundární struktury okolo neuronů a krevních cév, jak ukazuje **Obr. 2**. Jádra nádorových buněk jsou protáhnutá a úhlová a jejich cytoplasma je fibrilární a eosinofilní. Vaskulární proliferace a nekróza se u astrocytomů neprojevuje. Zásadním rozdílem mezi druhým a třetím stupněm je nález mitotické aktivity v nádorové tkáni (Ichimura et al. 2015).

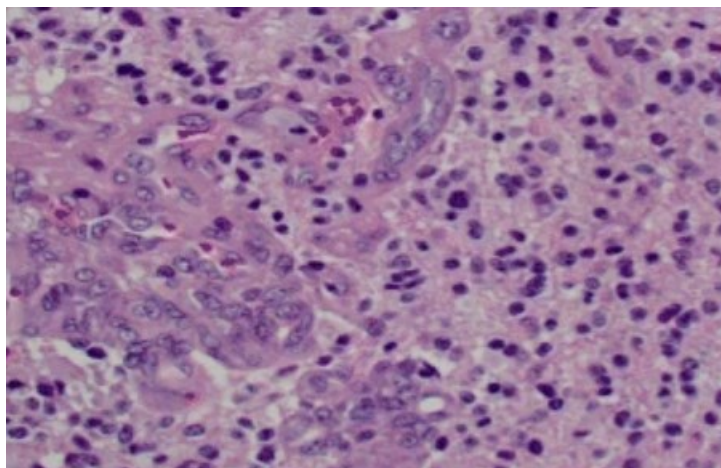


**Obrázek 2:** **a.** Astrocytom WHO grade 2, sekundární struktura nádorových buněk shlukujících se okolo krevních cév a neuronů, **b.** astrocytom WHO grade 3 s mitotickou aktivitou (zvětšení x200, barveno HE). Převzato z Ichimura et al. (2015).

Nejvýznamnějším molekulárním ukazatelem astrocytomů dospělých je mutační stav genu *IDH1* (společně s jeho mitochondriálním homologem *IDH2*). Identifikace jeho mutačního stavu je významná pro predikci prognózy u pacientů, jelikož mutace v genu koreluje s celkovým lepším celkovým přežitím pacientů s astrocytomy druhého a třetího stupně nezávisle na typu léčby (Hartmann et al. 2010). Dále to jsou mutace genů *TP53* a *ATRX*, které řadí nádor do astrocytomů. Tyto molekulární změny mohou být prokázány imunohistochemickou detekcí (Ichimura et al. 2015).

## Glioblastomy

Glioblastomy představují nejagresivnější kategorii difúzních gliomů. V histologickém řezu nádorové tkáně dominuje astrocytární diferenciace s jadernými atypii, mitotickou aktivitou, mikrovaskulární proliferací (ukazuje **Obr. 3**) a nekrózou (Lakomý et al. 2018). Populace nádorových buněk není uniformní a skládá se z malých buněk s minimální cytoplazmou a velkých buněk s několika jádry (Raza et al. 2002). Rozlišujeme dva typy glioblastomů - primární glioblastomy, které pozorujeme u starší populace a vznikají *de novo*. A sekundární glioblastomy, které se vyvíjí ze svých nízkostupňových prekurzorů hlavně u mladších pacientů (Ohgaki a Kleihues 2007). Toto klinické dělení bylo potvrzeno nálezem *IDH1* mutací u sekundárních glioblastomů, zatímco u primárních nikoli (Yan et al. 2009).



**Obrázek 3:** Glioblastom s mikrovaskulární proliferací, barveno hematoxylinem (zvětšení x400). Převzato z Xu a Li (2016).

V minulosti byly identifikovány hlavní genetické události probíhající v glioblastomech. Jedná se o inaktivaci tumor supresorových drah proteinů p53 a retinoblastomu (RB), deregulaci signalizační dráhy růstových hormonů prostřednictvím amplifikace a mutace v genech pro tyrozin kinázové receptory a aktivaci dráhy fosfatidylinozitol-3-OH kinázy (PI3K) (McLendon et al. 2008). Genetické změny definující primární glioblastomy jsou podle WHO CNS5 následující: absence mutace *IDH* genu, přítomnost mutací v promotorech genů *TERT* a *EGFR* a numerické změny chromozomů 7 a 10 (Louis et al. 2021). Dalšími často pozorovanými molekulárními znaky glioblastomů jsou:

- homozygotní mutace genu pro inhibitor cyklin dependentní kinázy 2A/2B (*CDKN2A/2B*)
- mutace genu pro homolog fosfatázy a tenzinu (*PTEN*)
- mutace v genu *TP53*
- mutace v genu pro kinázu Pi3k
- amplifikace genu pro receptor destičkového růstového faktoru alfa (*PDGFRA*)
- ztráta či mutace v genu pro neurofibromatózu I. typu (*NF1*)
- a hypermethylace promotoru genu pro O6-metylguanin metyltransferázu (*pMGMT*) (Aldape et al. 2015).

Glioblastomy vykazují vysokou míru vnitřní a vnější nádorové heterogenity, k čemuž přispívá nádorové mikroprostředí. V tomto mikroprostředí nalézáme škálu nenádorových buněk, mezi které se řadí například buňky imunitního systému, vaskulární buňky a další gliální buňky.

Nejstudovanějším složkou nádorového mikroprostředí glioblastomu jsou makrofágy asociované s nádory neboli TAMs, jež mají imunosupresivní vlastnosti a podporují růst nádoru. Mikroprostředí glioblastomu je také proangiogenní a zánětlivé. To vede k expresi adhezních molekul na endoteliálních buňkách a k potlačení těsných spojů, což vytváří vysoce propustnou hematoencefalickou bariéru (Chen a Hambardzumyan 2018). Další velmi významnou charakteristikou mikroprostředí glioblastomu jsou oblasti nekrózy, jejíž míra koreluje s celkovým přežitím pacientů. Vysvětlení pro tento vztah spočívá ve zvýšené aktivitě vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) v důsledku hypoxického prostředí. VEGF stimuluje angiogenezi, a tím dělá populaci nádorových buněk na periférii nekrotické oblasti více rezistentní vůči léčbě radio- či chemoterapií (Raza et al. 2002).

### 3. Genetické změny u mozkových gliomů

U mozkových nádorů byla popsána celá řada genetických změn. Může se jednat jak o početní nebo strukturní chromozomové aberace, tak o mutace různých genů. Mezi nejčastější početní změny patří trizomie chromozomu 7 a monozomie chromozomu 10. Mezi další numerické změny v karyotypech gliomů se řadí ztráty gonozomů, ztráty chromozomu 22, double minute chromozomy a také různé stupně ploidie (Thiel et al. 1992).

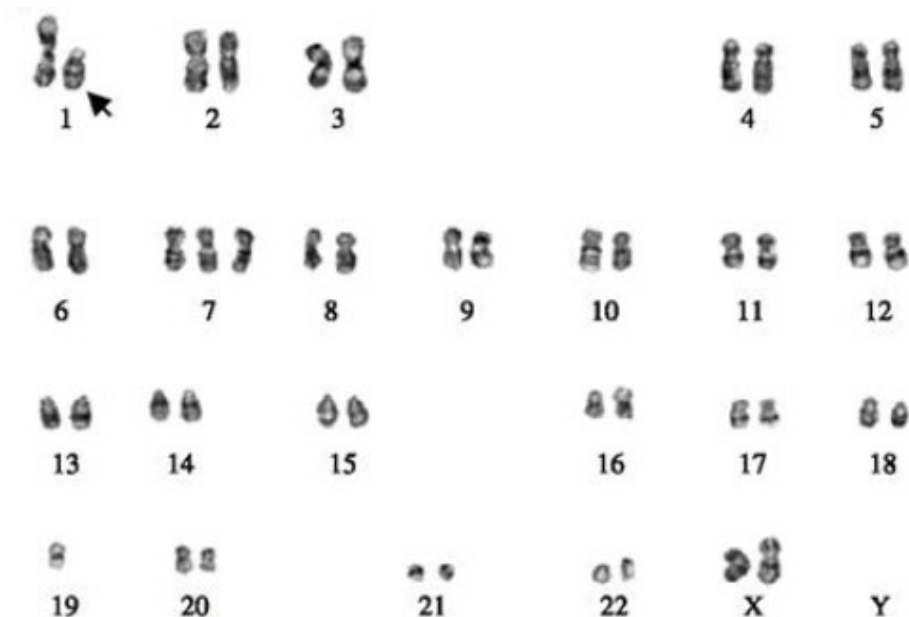
Genetická nestabilita je klíčovým faktorem přispívajícím k progresi difúzních gliomů. Zisky chromozomu 7 a ztráty chromozomu 10 jsou často doprovázeny rozsáhlými genomickými přestavbami, které vedou ke ztrátě tumor-supresorových genů a amplifikaci onkogenů (Ceccarelli et al. 2016). Chromozom 7 nese několik významných onkogenů, včetně genu *EGFR*, který je v gliomech často amplifikován a nadměrně exprimován (Ceccarelli et al. 2016). Zvýšení počtu kopií chromozomu 7 vede k aktivaci onkogenních signálních drah jako jsou Pi3k/Akt a Ras/Raf/Mek/Erk, což následně způsobí nekontrolovaný růst nádorových buněk a zvýší jejich agresivitu (Verhaak et al. 2010). Trizomie chromozomu 7 může také zesílit expresi dalších onkogenů, jako je *MET* (epitelo-mezenchymální tranziční faktor) a *CDK6* (cyklin-dependentní kináza 6), a to dále podporuje růst a invazivitu nádoru.

Monozomie chromozomu 10 je často asociována se ztrátou tumor-supresorového genu *PTEN*, jež je hlavním negativním regulátorem Pi3k/Akt signální dráhy. Hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu a apoptózy a jeho ztráta může také vést k nekontrolovanému buněčnému

dělení (Wang et al., 2015). Aktivace těchto signálních drah v důsledku numerických chromozomových změn vytváří prostředí, které podporuje agresivitu a invazivitu nádorových buněk (McLendon et al. 2008). Numerické změny tak společně přispívají ke genetické různorodosti difúzních gliomů a ovlivňují jejich biologické chování a klinický průběh onemocnění.

## Kodelece 1p/19q

V buňkách oligodendrogliomů dochází k delecí krátkých ramen chromozomu 1 a dlouhých ramen chromozomu 19, kterou označujeme jako kodeleci 1p/19q. Kodelece je primárně důležitá pro klasifikaci gliomů nižších stupňů a pacienti s kodelecí mají zvýšenou dobu celkového přežití (Louis et al. 2021). Ke ztrátě heterozygotnosti dochází na chromozomu 19 v oblasti 19q13.2q13.4. Pro chromozom 1 je to oblast 1p13pter (Reifenberger et al. 1994). V oligodendroglálních buňkách pravděpodobně dochází k nebalancované centromerické nebo pericentromerické translokaci  $t(1;19)(q10;p10)$ , jak ukazuje **Obr. 4**. V důsledku této nebalancované přestavby dochází ke ztrátě 1p a 19q. K pravděpodobnosti této fúze přispívá také silná homologie mezi centromerickými oblastmi chromozomů 1 a 19 a jejich kolokalizace v jádrech prekurzorových či zralých gliálních buněk (Jenkins et al. 2006). Mutace v tumor supresorovém genu *TP53* se často vzájemně vylučuje s přítomností kodelece 1p/19q, ale obě tyto aberace významně korelují s mutacemi v *IDH* genu (Ichimura et al. 2009). Tento nález popsala již studie z roku 1996, ve které autoři detekovali častou absenci mutace *TP53* v oligodendroglíomech s kodelecí 1p/19q (Weber et al. 1996).



**Obrázek 4: Karyotyp pacienta s oligodendrogliomem.** Šipka ukazuje na t(1;19)(q10;p10). Převzato z Jenkins et al. (2006).

## Amplifikace genu *EGFR*

Častým nálezem u nemocných s glioblastomy je amplifikace genu *EGFR*. Gen *EGFR* se nachází na chromozomu 7 v pozici 7p12. *EGFR* kóduje 170kDa transmembránový tyrozin kinázový receptor epidermálního růstového hormonu (EGFR). Lze jej nazývat také HER (angl. human EGFR related) nebo ErbB1, jelikož je jedním ze čtyř tyrozin kinázových receptorů (TKR) z proteinové rodiny ErbB (Biscardi et al. 1999). Fosforylace tyrozinů je významný způsob přenosu signálu mnohobuněčných organismů. TKR zprostředkovávají transdukcí signálů vedoucí k buněčné diferenciaci, růstu, migraci a přežívání buněk. Mikroprostředí gliomů je kyselé, hypoxické a s nízkou dostupností živin, tudíž nádorové buňky takto adaptují svou metabolickou aktivitu pro přežití (Oprita et al. 2021).

Tyrozin kinázové receptory po nasednutí ligandu homo- či heterodimerizují a několik tyrozinových zbytků je autofosforylováno. Jedná se o tyrosiny na karboxylovém konci receptoru EGFR, který také slouží jako vazebné místo pro cytosolické signální proteiny nesoucí SH2 (Src homology 2) doménu. Signální molekuly jako například proteiny rodiny Shc (Src homology 2 domain-containing) a  $\gamma$  podjednotka fosfolipázy C (PLC $\gamma$ ) svou vazbou na další molekuly s jejich následnou fosforylací přenášejí signál, který následně vyústí v syntézu DNA ze žádoucích lokusů (Biscardi et al. 1999). Mezi hlavní downstream události, které EGFR

signalizaci může spouštět patří dráhy zahrnující PLC $\gamma$ /protein kináza C (PKC), Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase (MAPK), Pi3k/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) a Jak/Stat3 (Han a Lo 2012).

V buňkách gliomů vyšších stupňů, primárně glioblastomů, dochází ke zvýšené expresi TKR v důsledku mnohonásobné amplifikace příslušných genů. K amplifikaci genu *EGFR* dochází buď intrachromozomálně nebo ji můžeme pozorovat extrachromozomálně v podobně tzv. double minutes (Eskilsson et al. 2018). Již v minulosti bylo navrženo, že k aktivaci EGFR signalizace vždy potřeba vazby ligandu a aktivní dimery mohou existovat pouze jako důsledek jejich zvýšené exprese (Schlessinger 2000). V nepřítomnosti ligandů a při zvýšené expresi je EGFR autofosforylován, tím je aktivován a začíná tvořit komplexy s TANK-vázající kinázou (TBK1). Výsledkem je aktivace interferonového regulačního transkripčního faktoru IRF3 a aktivace prozánětlivých cílových genů (Guo et al. 2015).

Amplifikace *EGFR* není jediná změna, ke které v tomto genu dochází. Gen *EGFR* může nést také sekundární bodové mutace a/nebo delece. Dochází k nim ve většině případů později při progresi nádoru (Eskilsson et al. 2016). K těmto aberacím dochází v oblastech jak na intracelulární C-terminální doméně, tak na extracelulární N-terminální doméně receptoru (Ekstrand et al. 1992). U glioblastomů známe tyto varianty: *EGFRvI* (delece N-terminální části), *EGFRvII* (delece exonů 14–15), *EGFRvIII* (delece exonů 2–7), *EGFRvIV* (delece exonů 25–27) a *EGFRvV* (delece exonů 25–28), přičemž varianty *EGFRvII* a *EGFRvIII* jsou onkogenní. *EGFRvIII* je nejfrekvencovanější varianta – takový receptor ztrácí ligand-vazebnou doménu a je konstitutivně aktivní nezávisle na přítomnosti ligandu. Jeho kinázová aktivita je slabší v porovnání s kompletním zdravým receptorem, i přesto dokáže dodat nádoru růstovou výhodu (An et al. 2018). Mutovaný receptor samostatně nedokáže transformovat zdravé buňky na nádorové, ale přispívá k angiogenezi tumoru, zatímco nemutovaný, ale amplifikovaný *EGFR* stojí za nádorovou invazivitou. Často tak nacházíme tyto změny *EGFR* v buňkách glioblastomu současně (Eskilsson et al. 2018).

## **Delece genu *PTEN***

Dalším častým nálezem v buňkách glioblastomu je delece genu *PTEN*. Gen *PTEN* leží na dlouhém rameni chromozomu 10 v pozici 10q3.3 a kóduje tumor-supresorový protein. Protein PTEN je 47kDa protein a slouží primárně jako lipidová a proteinová fosfatáza v mnoha

buněčných procesech jako je apoptóza, buněčný cyklus, migrace a růst buněk. Normálně fungující PTEN umlčuje signalizaci Akt kinázy, jejíž cílové geny podporují růst a proliferaci buněk. Katalytickou aktivitou PTEN je defosforylace 3'OH pozic na inozitolových kruzích fosfatidylinozitol fosfátů, konkrétně fosfatidylinozitol-3,4,5-trifosfátu (PIP3). Je tedy protichůdcem aktivity kinázy Pi3k, která hraje roli v aktivaci Akt kinázy (Knobbe et al. 2002). Mechanismus brždění růstu buněk prostřednictvím PTEN spočívá v regulaci kontrolního bodu buněčného cyklu ve fázi G<sub>1</sub>. V jádře PTEN vykazuje taktéž růst-inhibující aktivitu, ale nezávislou na inaktivaci Pi3k/Akt dráhy (Koul 2008).

Nejčastěji pozorovanými změnami u gliomů vyšších maligních řádů v kontextu genu *PTEN* jsou bodové mutace nebo homozygotní delece, které ústí v inaktivaci funkce kódovaného proteinu (Koul 2008). Ztráta jeho aktivity způsobí hromadění PIP3 v plazmatické membráně, což vede ke zvýšené rekrutaci a aktivaci Akt kinázy a její downstream signalizace.

PTEN může být také nepřímým inhibítozem aktivity Ras/MAPK dráhy anebo modulátorem p53-dependentní signalizace prostřednictvím fosforylace ubikvitin ligázy MDM2 (Mouse double minute 2) aktivní Akt kinázou. PTEN tak chrání p53 před MDM2-závislou degradací (Knobbe et al. 2002). Díky neschopnosti proteinu PTEN inhibovat signalizaci PIP3K/Akt dráhy je MDM2 umožněn vstup do jádra, kde může p53 degradovat a ztrácí tak svou tumorsupresorovou schopnost (Koul 2008).

Protein-fosfatázová aktivita PTEN byla v posledních letech také středem výzkumného zájmu. PTEN dokáže defosforylovat zbytky serinu, threoninu a tyrozinu u substrátů jako je například FAK kináza (focal adhesion kinase), Src proteiny, substráty inzulinového receptoru a další, a tak ovlivňuje funkce těchto proteinů. Ukázalo se, že PTEN hraje roli i v regulaci glykolytické dráhy. Defosforyluje enzym fosfoglycerát kináza 1, který prochází autofosforylací pro svou aktivaci a je prvním enzymem glykolýzy. Tímto mechanismem PTEN inhibuje glykolýzu a produkci ATP. Chybějící aktivita PTEN tak dodává nádorovým buňkám potřebnou vysokou míru přísunu energie prostřednictvím glykolýzy (Qian et al. 2019).

Ztráta aktivity PTEN stojí také za vysokou kolektivní invazivitou buněk gliomů. Jeho absence výrazně zrychluje migraci buněk prostřednictvím remodelace cytoskeletálního aktinu a udržování kontaktu mezi gliálními buňkami. Tato funkce vyžaduje aktivaci AMPK kinázy (proteinová kináza aktivovaná adenosin-monofosfátem). AMPK je zodpovědná za regulaci



kontraktility a organizace aktinu a za maturaci mezibuněčných spojů. Aktivita AMPK také nepřímo zvyšuje produkci energie a tím podporuje udržení motility migrujících buněk díky regulaci polarizovaného transportu mitochondrií do popředí buněk (Peglion et al. 2022).

## **Delece lokusu *CDKN2A/B***

V gliomech často dochází k homozygotní deleci lokusu *CDKN2A/B* a tento nálezn je považován za významný negativní prognostický ukazatel pro pacienty s difúzními gliomy nezávisle na stavu *IDH* genu (Appay et al. 2019). Inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A/2B (*CDKN2A/B*) je gen lokalizovaný na chromozomu 9 v pozici 9p21.3. Lokus kóduje dva tumor supresory. Jedná se o dvě různé sestříhové varianty vznikající čtením společného exonu v různých čtecích rámcích - protein p14<sup>ARF</sup> (β transkript) a p16<sup>INK4A</sup> (α transkript) (Stott et al. 1998). Oba jsou považovány za významné ukazatele buněčné senescence.

Protein p14<sup>ARF</sup> hraje roli v zastavení buněčného cyklu v kontrolních bodech mezi fázemi G<sub>1</sub>/S a G<sub>2</sub>/M. Jeho role spočívá v zadržení Mdm2 v jádře a nepřímo tak aktivuje p53 dráhu, která buněčný cyklus zastaví. MDM2 s navázaným p53 totiž vyžaduje transport do cytoplazmy pro provedení své úlohy v proteozomální degradaci p53 (Agrawal et al. 2006).

Protein p16<sup>INK4A</sup> je součástí p16/cyklin-dependentní kináza (CDK)/pRb tumorsupresorové dráhy. Funkce nefosforylovaného pRb je zastavení buněčného cyklu v G<sub>1</sub> fázi. Ve fosforylovaném stavu propouští buňku do syntetické fáze buněčného cyklu. Zvýšená exprese p16<sup>INK4A</sup> indukuje zastavení růstu buněk prostřednictvím inhibice daných cyklin dependentních kináz, CDK4 a CDK6, které tak nemohou fosforylovat protein pRb (Ohtani et al. 2004).

V novém vydání WHO CNS5 je nálezn delece/mutace *CDKN2A/B* pokládán za dostatečný průkaz čtvrtého stupně astrocytomů, jelikož je asociován s vysokou mírou agresivity onemocnění. A to nezávisle na přítomnosti či absenci mikrovaskulární proliferace v nádorové tkáni, která je obecně pro čtvrtý stupeň vyžadována (Louis et al. 2021).

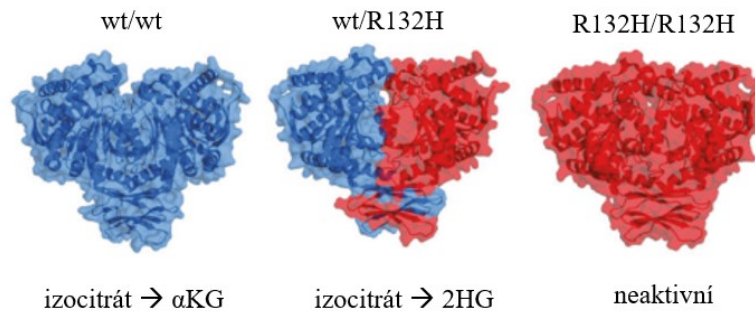
## **Mutace *IDH* genu**

Mezi hlavní genové mutace charakterizující difúzní gliomy patří mutace *IDH* genu. Rok 2008 je považován za velký milník ve výzkumu gliomů, kdy Parsons et al. poprvé prokázali mutaci *IDH1* genu v glioblastomech pomocí sekvenace exomu (Parsons et al. 2008). Jedná se o gen na chromozomu 2 v pozici 2q34 kódující NADP<sup>+</sup> (nikotinamidadenin dinukleotidfosfát)

dependentní enzym izocitrát dehydrogenázu. Rozlišujeme cytosolický a peroxisomální enzym *IDH1* a mitochondriální *IDH2*, nicméně oba enzymy sdílí výraznou sekvenční homologii a zastávají stejnou funkci. Existuje třetí izoforma tohoto enzymu, *IDH3*, která je sekvenčně odlišná a zastává funkci v Krebsově cyklu. Gen *IDH3* nemá zatím žádnou prokázanou úlohu v malignitách (Ichimura et al. 2015).

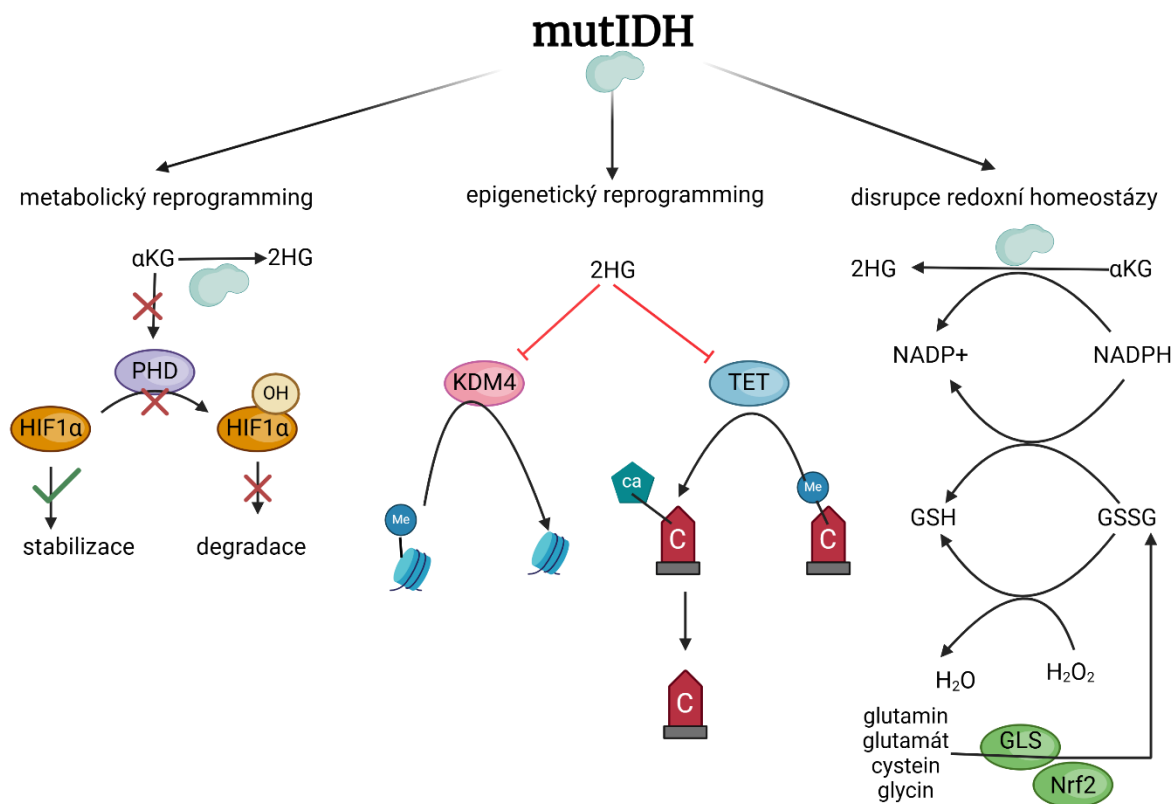
Všechny mutace *IDH* genu v gliomech řadíme mezi tzv. missense mutace. Kanonická nejčastěji nalézaná mutace zasahuje arginin v pozici 132 (R132) v genu *IDH1* a arginin v pozici 172 v genu *IDH2* (Ichimura et al. 2015). *IDH*-mutované mozkové nádory jsou nejčastěji nosiči heterozygotní bodové mutace v *IDH1*, záměny guaninu za adenin, která zapříčiní substituci argininu na histidin v pozici 132 (R132H). Tato substituce způsobí ztrátu normální funkce enzymu a vzniká neoenzym (Yan et al. 2009).

Zdravý enzym funguje jako homodimer a katalyzuje oxidativní dekarboxylaci izocitrátu na  $\alpha$ -ketoglutarát ( $\alpha$ KG) za současné redukce  $\text{NADP}^+$  na NADPH. Po získání mutace, exprimovaný enzym nabývá zcela nové aktivity. Neoenzym dokáže katalyzovat redukci  $\alpha$ -ketoglutarátu na R(-)-2-hydroxyglutarát (2HG). Akumulace 2HG v buňkách se ukázala jako rizikový faktor pro vývoj nádorů CNS (Dang et al. 2009). Zároveň mutovaný protein není schopen kooperovat s druhou nepoškozenou podjednotkou a vytvářet tak funkční homodimer. Heterodimer wt/R132H zůstává v konformaci bez ligandu nebo v quasi-otevřené konformaci s navázaným  $\text{NADP}^+$  a je zodpovědný za produkci 2HG, jak ukazuje **Obr. 5**. Vedlejší řetězec pozice argininu R132 za obvyklých podmínek tvoří tři unikátní vodíkové vazby jak s  $\alpha$ KG, tak s  $\beta$ -karboxylovou skupinou izocitrátu. Substituce v tomto místě za jakoukoliv ze šesti aminokyselin pozorovaných v difúzních gliomech (histidin, serin, glycin, cystein, valin nebo leucin) mění sterické i elektrostatické chování enzymu při interakci s izocitrátem (Zhao et al. 2009). Inhibice  $\alpha$ KG má dopad na proteiny, které reguluje, a to jsou proteiny účastníci se řady fyziologických procesů jako je citlivost na hypoxii, demethylace histonů, změny metylace DNA, ad. (Aldape et al. 2015).



**Obrázek 5: Dimerizace enzymu IDH1.** Nepoškozené monomery wt/wt tvoří normální katalytický homodimer, Heterodimer wt/R132H je zodpovědný za přeměnu izocitrátu na R(-)-2-hydroxyglutarát (2HG). Dimerizace dvou poškozených podjednotek vytváří katalyticky neaktivní homodimer. Převzato a upraveno dle (S. Han et al. 2020).

Globální dopad pro buňku lze shrnout do tří bodů, které ilustruje **Obr. 6**: přeprogramování metabolismu, epigenetické přeprogramování a redoxní dysbalance (Han et al. 2020). Jelikož je  $\alpha$ KG potřeba pro prolylhydroxylázu (PHD), která následně pomáhá degradaci faktoru HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ), je tento hypoxický faktor stabilizován při nedostatku  $\alpha$ KG. HIF-1 $\alpha$  je transkripční faktor senzitivní k hladině buněčného kyslíku a reguluje expresi genů spřažených s metabolismem glukózy, angiogenezí a dalšími signalizačními drahami významnými pro růst nádoru. Takto stabilizovaný HIF-1 $\alpha$  má za důsledek zvýšenou genovou expresi těchto genů. *IDH1* tak můžeme označit jako tumorsupresorový gen (Zhao et al. 2009). Absence  $\alpha$ KG není jediným důvodem vysvětlujícím stabilizaci HIF-1 $\alpha$ . Onkometabolit 2HG dokáže kompetovat o vazbu s dioxygenázami a inhibovat je díky své strukturní podobnosti s  $\alpha$ KG. Mezi takové dioxygenázy patří mimo jiné  $\alpha$ KG-dependentní prolylhydroxyláza, TET 5-metylcytosin hydroxylázy (enzymy z rodiny 'ten-eleven translocation') a různé histon demetylázy. Inhibovaná PHD tudíž nemůže degradovat HIF-1 $\alpha$  (Xu et al. 2011).



**Obrázek 6: Schéma důsledků mutovaného enzymu IDH.** Absence  $\alpha$ -ketoglutarátu ( $\alpha$ KG) způsobí stabilizaci hypoxického faktoru HIF-1 $\alpha$ . Alternativní produkt R(-)-2-hydroxyglutarát (2HG) kompetitivně inhibuje působení lysin-sepcifické histon-demetylázy (KDM4) a Ten-eleven translokační metylcytosin dioxygenázy (TET). Aktivita mutantního enzymu (mutIDH) spotřebovává NADPH na produkci NADP+, což potlačuje detoxikaci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PHD: prolylhydroxyláza, Me: metylová skupina, ca: karboxylová skupina, GSH: glutation, GSSG: glutation disulfid, Nrf2: transkripční faktor příbuzný jadernému erytroidnímu faktoru 2, GLS: glutamát-cystein ligáza. Vytvořeno v BioRender.com dle Han et al. (2020).

Mutace v *IDH1* a *IDH2* vedou v gliomech také ke změnám metylace histonů a DNA v celém genomu díky akumulaci 2HG. V buňkách postižených *IDH* mutacemi dochází ke zvýšené metylaci jak histonů, tak DNA primárně v oblastech cytosin-fosfát-guanin (CpG) ostrůvků. CpG dinukleotidy jsou místa na DNA, kde dochází k transferu metylového zbytku na 5' pozici cytosinu. V případě gliomů tomuto zvýšení metylace specificky v oblastech promotorů říkáme gliomový metylační fenotyp CpG ostrůvků (G-CIMP). TET hydroxylázy jsou právě ty dioxygenázy inhibované 2HG, které odstraňují metylační značku. Status G-CIMP se ukázal také jako jeden z prognostických biomarkerů onemocnění (Malta et al. 2018).

Destrukce redoxní homeostázy je posledním zmiňovaným důsledkem poškozeného enzymu. Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) se podílí na klíčových aspektech biologie rakoviny, jako je zvýšená genomická nestabilita, ztráta růstové kontroly a invazivita buněk. Nadměrné hladiny ROS poškozují DNA, lipidy a proteiny, což zvyšuje oxidační stres v buňkách s mutovaným *IDH*. Mutace *IDH* zvyšují afinitu enzymu k NADPH a  $\alpha$ -KG, čímž se narušují procesy snižování ROS, jako je redukce glutation disulfidu. Výsledkem je hromadění ROS a oxidační poškození, které je charakteristické pro *IDH*-mutované gliomy. Gliomové buňky s mutací *IDH* vykazují silný oxidační stres a zvýšenou expresi enzymů, jako je mangan superoxiddismutáza. Zablokování antioxidantních drah, například syntézy glutationu, řízené faktorem Nrf2, může být účinnou strategií pro cílenou léčbu nádorů s mutací *IDH* (Han et al. 2020).

## Mutace genu *ATRX*

Další genovou mutací asociovanou s difúzními gliomy je mutace genu *ATRX*. Jaderný faktor *ATRX* s anglickým názvem ‚alpha-thalassemia/mental retardation X-linked‘ je gen ležící na chromozomu X v pozici Xq21.1 a kóduje tumor supresor *ATRX* pocházející z rodiny proteinů SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) (Picketts et al. 1996). *ATRX* hraje důležitou roli v dynamice genomu buněk. Má svou funkci v mnoha buněčných procesech jako je remodelace chromatinu, regulace transkripce, opravy DNA a údržba funkce telomer (Aguilera a López-Contreras 2023). Mezi mnohé a významné partnery proteinu *ATRX* patří například Daxx protein (death-domain associated protein). Komplex *ATRX*-Daxx funguje jako dráha pro tvorbu specializovaného chromatinu v repetitivních oblastech DNA a dalších oblastech konstitutivního heterochromatinu. Daxx se specificky váže k histonové variantě H3.3 a slouží k její depozici na DNA. *ATRX* tak přímo přispívá k inkorporaci histonu H3.3 do chromatinu v telomerických a pericentrických oblastech (Lewis et al. 2010). V případě tzv. ‚loss of function‘ mutace genu *ATRX* dochází k destabilizaci telomer chromozomů.

V buňkách astrocytomů nejčastěji dochází ke ztrátě exprese genu *ATRX* v důsledku mutací. Mutační stav *ATRX* koreluje s věkem pacientů. Častěji je nacházen mutován u mladších s nízkostupňovými gliomy. Mutace *ATRX* společně s *IDH* mutacemi jsou asociovány s celkovým lepším přežitím nemocných s nízkostupňovými gliomy (Haase et al. 2018).

Jednou z hlavních vlastností nádorových buněk je jejich schopnost uniknout senescenci. Telomery chromozomů somatických buněk se v průběhu jejich života zkracují s každým dělením v důsledku neaktivního enzymu telomerázy. Mnoho typů malignit vykazuje nově nabytou aktivitu právě tohoto enzymu. Existuje další možný způsob, kterým si nádorové buňky zajistí údržbu telomer. Jedná se o alternativní mechanismus prodlužování telomer (ALT), který využívá homologicky řízenou rekombinaci díky ztrátě specifických chromatin remodelujících proteinů a vzniku dvouřetězcových zlomů (Lovejoy et al. 2012). Buňky astrocytomů, které obsahují mutaci v *ATRX* vykazují tento ALT fenotyp, což vede ke zvýšené genomické nestabilitě. Odlišným případem jsou oligodendrogliomy, u kterých dochází k reaktivaci telomerázy v důsledku mutace v promotoru *TERT* genu (Louis et al. 2016). Mutační varianty *ATRX* je možno vyšetřit imunohistochemickou detekcí.

## **Mutace promotoru genu *TERT***

V gliomech je také často nacházena mutace promotoru genu *TERT*. Gen *TERT* leží na chromozomu 5 v oblasti 5p15.33 a kóduje katalytickou podjednotku enzymu telomerázy. Telomeráza je reverzní transkriptáza. Katalytická podjednotka společně s RNA komponentou tvoří nejdůležitější součást telomerázového komplexu zodpovědného za údržbu konců eukaryotických chromozomů. Telomeráza je ve většině dospělých buněk transkripčně umlčena a její reaktivace je spojována s buněčnou nesmrtností (Yuan et al. 2016). Mutace promotoru genu *TERT* (*pTERT*) hrají klíčovou roli v patogenezi difúzních gliomů. Tyto mutace vedou ke zvýšené expresi telomerázy, což podporuje neomezené dělení nádorových buněk a jejich schopnost vyhnout se senescenci. Jsou známy dvě primární mutace *pTERT* - jedná se o záměny v pozicích C228T a C250T. Tyto změny přináší enzymu nová vazebná místa pro transkripční enhancery (Powter et al. 2021). Nález mutace *pTERT* koreluje s diagnózou oligodendrogliomů a primárních glioblastomů a zároveň s horší prognózou pacientů (Yuan et al. 2016).

V oblasti *pTERT* dochází také k epigenetickým změnám, a to k hypermetylaci promotoru. Hypermetylace promotorových oblastí často souvisí s umlčením exprese, nicméně v tomto případě se nabízí mechanistické vysvětlení - metylové skupiny na promotoru brání vazbě transkripčních represorů, což má za důsledek zvýšenou expresi reverzní transkriptázy (Lee et al. 2020).

## Epigenetické změny

Kromě genetických změn jsou v buňkách mozkových nádorů pozorovány četné epigenetické změny. Prognosticky významnou epigenetickou změnou v gliomech je například hypermetylace promotoru genu pro O<sup>6</sup>-metylguanin-DNA metyltransferázu (*pMGMT*). Jedná se o gen ležící na chromozomu 10 v pozici 10q26 kódující DNA reparační enzym. Promotor tohoto genu obsahuje významný CpG ostrůvek, který bývá metylován, čímž je gen transkripčně umlčen. Pokud promotor není metylován, gen je přepisován a funkční enzym odstraňuje alkylovou skupinu z šestého kyslíku guaninového nukleotidu. Mezi chemoterapeutické látky využívané k léčbě maligních gliomů se řadí právě alkylační činidla (např. temozolomid, TMZ), která přidávají alkylovou skupinu na tuto pozici na DNA, což indukuje cytotoxicitu a apoptózu prostřednictvím reparačního mechanismu mismatch repair (MMR) (Riemenschneider et al. 2010).

Metylační stav *pMGMT* není oficiálním biomarkerem pro diagnózu gliomů, nicméně je velmi důležitým prognostickým ukazatelem odpovědi na léčbu alkylačními činidly, jelikož funguje proti jejich účinku a zbavuje DNA alkylační značky. Klinické studie ukázaly rozdíl v celkovém přežívání pacientů léčených alkylačními činidly v závislosti na přítomnosti metylace *pMGMT*. Pacienti, jejichž nádory obsahují metylovaný promotor lépe reagují na TMZ léčbu, zatímco maligní gliomy s promotorem bez metylace se stávají vůči TMZ rezistentní (Wick et al. 2014).

Přímý prognostický účinek metylačního stavu *pMGMT* bývá diskutován, jelikož je metylovaný *pMGMT* často nacházen společně s ostatními pozitivními prognostickými ukazateli jako například 1p/19q kódelece u oligodendrogliomů a *IDH* mutace u astrocytomů. Asociace se změnami na *IDH* genu může být vysvětlena globálními DNA metylačními změnami genomu nádorových buněk neboli G-CIMP fenotypem, které s sebou mutace nesou. Častěji tak pozorujeme ztrátu metylace *pMGMT* v gliomech s nepoškozeným *IDH* genem, jako jsou primární glioblastomy (Wick et al. 2014).

U různých nádorů, včetně gliomů, byly zaznamenány asociace metylace *pMGMT* s vyšší frekvencí konkrétních substitučních mutací v tumorsupresorových genech včetně *TP53* (Wick et al. 2014). Tento hypermutační fenotyp byl pozorován u vzorků z glioblastomů po léčbě chemoterapií. U nich se objevila asociace metylovaného promotoru *MGMT* s výrazným

posunem na spektru nukleotidových substitucí. Docházelo zde primárně k substitucím dinukleotidů G:C na A:T v oblastech mimo CpG ostrůvky. Z tohoto lze usuzovat na neschopnost buněk opravovat léčbou alkylované nukleotidy, a tudíž jsou zde poškozeny geny kódující enzymy zapojené do MMR opravného mechanismu (McLendon et al. 2008). Například u nízkostupňových gliomů byla popsána aberantní metylace promotoru genu *MLH3* umlčující tento reparační enzym dráhy MMR (Lhotska et al. 2015). Tento fakt ukazuje na propojenost drah v progresi nádoru, kdy epigenetická inaktivace *MGMT* může usnadnit bodové mutace *TP53* a dalších genů během nádorové progresi. Také léčba TMZ může dále zapříčinit vznik sekundární rezistence k tomuto chemoterapeutiku tím, že podpoří inaktivační mutace MMR genů (Wick et al. 2014). Fenomén hypermutačního fenotypu byl nicméně také probádán skupinou Kim et al., která v kategorii primárních glioblastomů tento je nepozorovala. Autoři této studie tak považují riziko TMZ-indukovaného hypermutačního fenotypu jako minimální pro pacienty s primárními glioblastomy (Kim et al. 2015).

## 4. Klonální vývoj

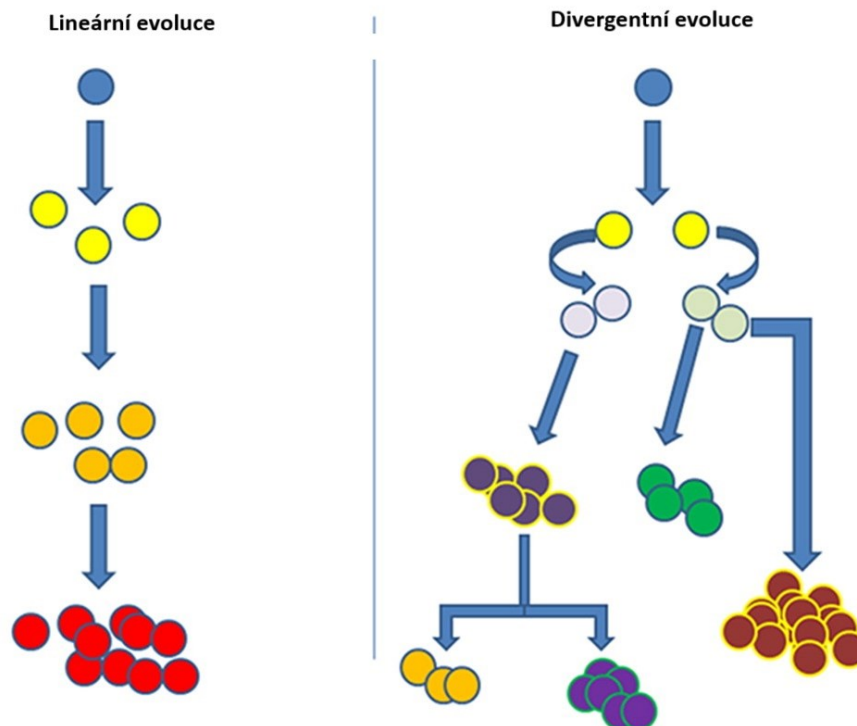
Za vznikem heterogenity gliomů (molekulární a fenotypické rozdíly v populacích buněk v rámci jednoho nádoru) stojí mechanismus klonální mikroevoluce na základě Darwinovských principů přirozeného výběru různými selekčními tlaky. K proliferační invazi jsou vybírány subpopulace gliomových buněk s nejlepšími adaptacemi na lokální kontext v nádorovém mikroprostředí. Adaptace se týkají kompetice o přežití a rozvoj schopností umožňujících nekonečnou proliferační signalizaci, indukci neoangiogeneze, rezistenci k buněčné smrti, přeprogramování metabolismu a úniku z imunitního dohledu. K rozvoji heterogenity přispívají nejen onkogenní somatické mutace, ale také epigenetické přeprogramování genomu a řada biochemických faktorů. Tyto mechanismy vedou k vytvoření složitých a velice dynamických populací nádorových buněk se schopností udržet růst gliomu a způsobit jeho relaps i přes veškeré klinicky dostupné léčebné protokoly (Lakomý et al. 2018).

Diverzifikace nádorových klonů a selekce subklonů probíhá v kontextu nádorové tkáně, která určuje selekční tlaky. Mezi nádorovými a zdravými buňkami dochází k reciprokým interakcím, které nádorové buňky využívají k remodelování mikroprostředí pro vlastní přežití a proliferaci. Model klonální evoluce podle Nowella předpokládá, že mutace se postupně hromadí a vedou k



postupné dominanci podklonů. Evoluční trajektorie nádorů jsou složité a větví se, jak předpokládal Nowell, podobně jako Darwinův strom evoluce (Nowell 1976). Klonální evoluce ze společných prekurzorů nádorových buněk je popisována například u identických dvojčat s akutní leukémií. Navíc, samotná léčba (chemo- či radioterapie) přináší nádorovým buňkám uměle vytvořený zdroj selekčního tlaku, který podléhá stejným principům evoluční biologie. Nejenže dostanou selekční výhodu buňky, které již mají mechanismy úniku před vlivem léčby, ale genotoxický účinek terapeutik může generovat nové mutace a změny v genomu přeživších buněk, které zvýší jejich fitness a maligní potenciál (Greaves a Maley 2012).

Klonální vývoj může být lineární či divergentní (větvený), jak ukazuje **Obr. 7**. Lineární model evoluce navrhl již Peter Nowell v roce 1976 (Nowell 1976). Model předpokládá akumulaci nových somatických mutací díky tlakům prostředí, které dceřiným buňkám dávají výhody v ohledu na fitness, než mají starší klony, a tak se tento nově vzniklý subklon stává dominantním. V modelu větvené evoluce je počáteční výchozí klon nádoru rozvíjen divergentním způsobem, a to tak, že dceřiné subklony získávají současně různé mutace a/nebo chromozomové aberace. V tomto modelu nicméně nedochází k dominanci jednoho dceřiného klonu nad ostatními, ale přežívají všechny. Všechny dceřiné klony se vyvíjí paralelně pod selekčními tlaky prostředí a vytváří se tak komplexní struktura nádoru a rozmanitější intratumorová heterogenita (He et al. 2023).



**Obrázek 7: Schéma lineárního a divergentního modelu klonální evoluce.** Převzato a upraveno dle Ampie et al. (2015).

Většina recidivujících gliomů je charakterizována společnou skupinou mutací a chromozomových aberací, které jsou pravděpodobně odvozeny od jedné prekurzorové buňky, stejně jako původní nádor. Léčba recidivujících tumorů je cílena na původní molekulární vzor gliomových buněk, čímž je opomíjena možnost nádoru vytvořit si nové biologicky relevantní aberace. A to buď spontánně v průběhu asymptomatického období vedoucího k recidivě či jako důsledek zvolené léčby, která zapříčiní vymizení chemosenzitivních klonů (Lass et al. 2012). Johnson et al. toto potvrdili nálezem různých driver mutací v původních a v recidivujících gliomech a navrhují, že recidivující nádory jsou často odvozeny z derivovaných buněk původního tumoru, které se oddělily velmi brzy v jeho evoluci (Johnson et al. 2014). To stejné vyplývá z výsledku studie skupiny Barthel et al., která ukázala, že přes polovinu driver mutací nalezených u původních nízkostupňových gliomů nelze detekovat u recidiv vyšších maligních stupňů (Barthel et al. 2019).

Migrace gliomových buněk může probíhat primárně skrz perivaskulární prostor a mozkový parenchym a nejinvazivnější z gliomů, glioblastom, tak může vytvořit recidivu na vzdálenějších místech od původní léze. Právě mezi těmito vzdálenými recidivami, které mohou vznikat

v opačné hemisféře, a lokálními recidivami je pozorován rozdíl v typu klonální evoluce. U vzdálených recidiv se objevují rozdílné skupiny aberací v genomu nádorových buněk v porovnání s původním tumorem. To naznačuje divergentní evoluci, zatímco lokální recidivy sdílí s původním nádorem většinu aberací, což svědčí o evoluci lineární (Kim et al. 2015).

Existuje několik dobře popsanych pozic v genomu, které jsou v gliomech zasaženy a kterým se věnovala předešlá kapitola. Tyto změny mají tendenci postupovat v definovaném pořadí během progresu do vyšších stupňů malignit. Za iniciační změnu při vzniku nádoru je u astrocytárních a oligodendroglialních gliomů považovaná mutace v pozici R132 genu *IDH1* mimojiné také proto, že vytváří mikroprostředí se zvýšenou genomickou nestabilitou (Lass et al. 2012). Společně s *IDH* mutací se také mutace genu *TP53* objevují relativně na začátku vývoje astrocytomů, zatímco mutaci či bialelickou ztrátu *PTEN* a amplifikaci *EGFR* vidíme u gliomů vyšších řádů (Weber et al. 1996; Ohgaki a Kleihues 2007; Yan et al. 2009). U oligodendrogliomů druhých stupňů se projevují kodelece 1p/19q a u třetích stupňů to jsou hlavně ztráty zasahující lokus *CDKN2A/B* (Bigner et al. 1999). Výzkumná skupina Centra nádorové cytogenomiky VFN a 1. LF UK v Praze experimentálně potvrdila metylaci promotorů, např. hypermetylace *pMGMT*, jako pozdější události v evoluci nádorového genomu, kterým předchází mutace v *IDH1* genu (Lhotska et al. 2016). Co se týče numerických aberací, dřívější událostí v evoluci je ztráta chromozomu 10, po níž následuje zisk chromozomu 7 (Barthel et al. 2019).

Jak již bylo zmíněno, na základě mutagenních vlastností může být léčba alkylačním chemoterapeutikem TMZ spojována s maligní progresí. Po této léčbě vykazují některé recidivující gliomy alternativní dráhu k vyšším stupňům malignity. Tyto tumory mívají známý, ale silně diskutovaný, hypermutační fenotyp a obsahují mutace v genech kódujících komponenty pRb a Akt-mTOR růst-supresorových signalizačních drah (Johnson et al. 2014). Nejčastěji se tento jev projevuje u *IDH*-mutovaných gliomů bez kodelece 1p/19q a nejméně často u *IDH* nemutovaných gliomů, nicméně u žádného ze subtypů gliomů není asociován se snížením celkového přežití pacientů (Barthel et al. 2019).

## 5. Léčba

Základními kroky při léčbě difúzních gliomů je chirurgická resekce, chemoterapie a radioterapie. Jelikož se jedná o invazivní a vysoce maligní rakovinné onemocnění mozkové tkáně, následuje paliativní péče dle symptomů nemocných. Cílem chirurgického zákroku je maximální odstranění nádoru při zachování neurologických funkcí. Chirurgické odstranění veškeré nádorové tkáně je obtížně z hlediska absence makroskopických hranic se zdravou tkání. Je proto výhodné při zákroku pracovat s identifikací funkčních oblastí a traktů a využívat zobrazovací techniky (angl. ‚image guided surgery‘). Jedním z dalších kroků léčby difúzních gliomů je radioterapie, která má za cíl zpozdit zhoršování neurologických a kognitivních schopností nemocných. Frakcionovaná radioterapie spočívá v aplikaci menších dávek záření po delší dobu a byla prokázána jako účinná v kontrolování růstu nádoru a zlepšování celkového přežití pacientů (Weller et al. 2021). Nejčastější přístup radioterapie při léčbě gliomů je administrace temozolomidu (TMZ). Mezi další používané léčebné látky patří například anti-angiogenní činidlo s názvem bevacizumab (Kirkpatrick a Sampson 2014). Schválených léčiv pro léčbu difúzních gliomů je málo. Jedním z důvodů je hematoencefalická bariéra, která se v mozkové tkáni skládá z endoteliálních buněk, kapilár a bazálních membrán. Tato jedinečná struktura v CNS zabraňuje většině protinádorových léků vstoupit z krve do mozku, což přináší problémy při vývoji protigliomových léčiv (Oberoi et al. 2016). Imunoterapie zahrnuje přeprogramování imunitního systému, aby působil proti nádorovým buňkám a představuje tak slibnou oblast výzkumu. Existuje také množnost využití přístupů genové terapie. Byly navrženy různé terapeutické přístupy využívající virové vektory: a) sebevražedná genová terapie, která zavádí cizí gen kódující enzym pro přeměnu proléčiva na toxický metabolit; b) onkolytické viry, které cílí na gliomové buňky a potenciálně se replikují v celém nádoru; a c) transdukce imuno-stimulačních molekul pro snížení imunitní suprese gliomů (Varela et al. 2023). Cílené terapie difúzních gliomů zahrnují použití léků, které specificky blokují molekulární dráhy důležité pro růst a přežití nádorových buněk. Mezi běžné inhibitory patří inhibitory tyrozin kinázy, které jsou zaměřeny na dráhu receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Další třída zahrnuje inhibitory angiogeneze, jež jsou zaměřeny na růstový faktor VEGF. Kromě toho se používají inhibitory dráhy PI3K/Akt/mTOR, které zasahují do kritických signálních drah podporujících buněčnou proliferaci a přežití u gliomů (Thakur et al. 2022).

## 6. Cíle

Cílem diplomové práce bylo:

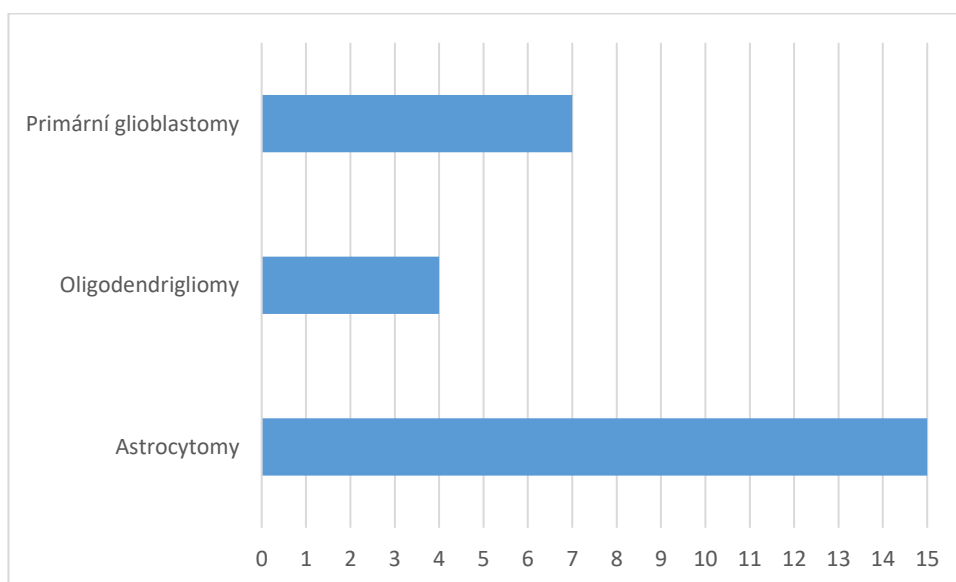
- porovnat genomové profily primárních a recidivujících mozkových gliálních nádorů dospělých a popsat kandidátní aberace se vztahem k progresi nádoru
- a provést analýzu typu klonálního vývoje u pacientů s vícečetnými resekcemi.

## 7. Materiál

### Soubor pacientů

V diplomové práci byly využity vzorky mozkové nádorové tkáně od 26 nemocných s histologicky prokázanými difúzními gliomy. Tito pacienti byli operováni na Neurochirurgické a neuroonkologické klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze (1. LF UK) a Ústavní vojenské nemocnice mezi lety 2004–2023 minimálně dvakrát a jejich tkáň společně s periferní krví byla analyzována v Centru nádorové cytogenomiky (CNC) Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK.

Chirurgické zákroky byly prováděny jako rutinní a plánované neurochirurgické operace. Od pacientů byl získán podepsaný informovaný souhlas pro použití odebraných vzorků k výzkumným účelům. Klinická a histo-patologická data byla získána z Neurochirurgické a neuroonkologické kliniky a oddělení patologie Ústřední vojenské nemocnice a 1. LF UK v Praze. Zastoupení subtypů difúzních gliomů při diagnóze v analyzovaném souboru ukazuje **Obr. 8**.



**Obrázek 8:** Zastoupení jednotlivých subtypů difúzních gliomů při první resekci nemocných ve vyšetřovaném souboru.

Vzorky mozkové nádorové tkáně byly analyzovány pomocí metody interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH) pro zjištění aberací nejznámějších a prognosticky významných

genetických markerů. Metoda MLPA („Multiplex-Ligation-dependent Probe Amplification“) byla použita k detekci genových mutací *IDH* genu. Metylační stav promotorů genů *MGMT* a *MLH3* byl vyšetřen metodou metylačně specifické MLPA (MS-MLPA). Pro MLPA analýzy byla z periferní krve pacientů izolována DNA a byla použita jako reference. Pro analýzu přítomnosti jednonukleotidových polymorfizmů a relativního počtu kopií DNA sekvencí byla použita mikročipová metoda aCGH/SNP array (Illumina).

## Chemikálie a roztoky

### Příprava buněčné suspenze z mozkové tkáně

- KCl (Lékárna VFN)
- Kyselina octová (Penta)
- Methanol (Penta)
- Redestilovaná voda (dH<sub>2</sub>O)
- PBS (lékárna VFN)
- Hypotonický roztok: 0,075 M KCl (2,796g KCl + 500 ml dH<sub>2</sub>O)
- Fixační roztok: kyselina octová a metanol (1:3)

### I-FISH

- Absolutní ethanol (Penta)
- dH<sub>2</sub>O
- 2x SSC: 50 ml 20x SSC (lékárna VFN) + 450 ml dH<sub>2</sub>O
- Alkoholová řada: 70% ethanol (700 ml EtOH + 300 ml dH<sub>2</sub>O), 85% ethanol (850 ml EtOH + 150 ml dH<sub>2</sub>O) a 95% ethanol (950 ml EtOH + 50 ml dH<sub>2</sub>O)
- Rubbercement (Fixogum-Rubber cement, Marabu)
- Mycí roztoky:
  - 0,4xSSC: 450 μl 0,05% Tween 20 + 100ml 20×SSC + 400ml dH<sub>2</sub>O
  - 2xSSC + 0,1% NP40 (Nonidet P40; Glenham Life Sciences): 50 ml 20×SSC + 449,5 ml dH<sub>2</sub>O + 0,5 ml NP40
- DAPI/antifade (Vectaschield Antifade Mounting Medium with DAPI, Metasystems)
- Imerzní olej (Immersol, Carl Zeiss)
- Hybridizační pufr pro lokus specifické sondy (LSI) (Metasystems)

- Značené lokus-specifické a centromerické DNA sondy (MetaSystems, Abbott Molecular)

### **Izolace DNA z periferní krve a mozkové tkáně**

- PBS (Lékárna VFN)
- Absolutní ethanol (Penta)
- Patentované chemikálie a roztoky od firmy Qiagen, Sigma:
  - Proteináza K
  - ATL pufr
  - RNáza
  - Lyzační pufr AL
  - Promývací pufr AW1 a AW2
  - Eluční pufr AE

### **Gelová elektroforéza**

- agaróza (Top-Bio s.r.o)
- GelRed (Biotium)
- 1% agarózový gel: 0,9 g agarózy + 90 ml 1x TAE pufru (Tris-acetát-acid-EDTA, Sigma)
- nanášecí pufr (Thermo Fisher)
- velikostní žebřík (GeneRuler DNA Ladder, Thermo Fisher)

### **MLPA a MS-MLPA**

- roztok TE (Tris-EDTA, Sigma)
- ddH<sub>2</sub>O
- LIZ délkový standard (ThermoFisher Scientific)
- Formamid (Penta)
- DNA jako pozitivní kontrola (izolovaná DNA z periferní krve pacienta)
- Patentované roztoky od firmy MRC Holland:
  - MLPA pufr
  - Ligáza-65 pufr A
  - Ligáza-65 pufr B
  - Ligáza-65



- Endonukleáza
- SALSA PCR směs primerů
- Polymeráza
- Komerční kity pro vyšetření charakteristických ukazatelů gliomů: SALSA MLPA Probemix P088 (1p/19q), P370 (*CDKN2A/B-IDH1-IDH2*) a ME012 (*pMGMT*)

### **aCGH/SNP**

- ddH<sub>2</sub>O
- anotovaná referenční genomová DNA (OneSeq Reference DNA Male/Female, Agilent Technologies)
- TE pufr (Tris-EDTA, Sigma)
- patentované reagenty firmy Agilent Technologies (příp. ředěné):
- 10x reakční restriční pufr (RE pufr)
- BSA
- Enzym AluI
- Enzym RsaI
- Random Primer
- 5x reakční pufr pro polymerázu
- 10x dNTPs
- Cyanine 3-dUTP (Cy3)
- Cyanine 5-dUTP (Cy5)
- Enzym ExoKlenow
- Cot-1 DNA
- 10x CGH blokující činidlo
- 2x HI-RPM hybridizační pufr

## 8. Metody

### **Zpracování mozkové nádorové tkáně**

Mozková nádorová tkáň byla přivezena do laboratoře CNC po chirurgické resekci pacienta v odběrové zkumavce s PBS roztokem a heparinem. Veškerá tkáň byla přenesena do

homogenizační zkumavky s kuličkami a doplníme PBS roztokem do požadovaného objemu (nejméně 1 ml ve 2ml homogenizační zkumavce). Homogenizační zkumavku byla přenesena do homogenizátoru na 45 vteřin při středním výkonu přístroje. Následně byly připraveny prázdné 1,5ml zkumavky v počtu podle objemu tkáně a analytická váhou byla každá zvážena. Homogenizovanou tkáň byla pomocí pipety rozdělena do zvážených zkumavek po cca 200  $\mu$ l. V případě, že byl dostatek materiálu pro provedení I-FISH analýzy nádorové tkáně, byly připraveny dvě zkumavky s 500  $\mu$ l homogenátu, které byly takto připraveny pro přípravu buněčné suspenze. Zkumavky s 200  $\mu$ l homogenátu byly umístěny do centrifugy při 9 °C a otáčkách 14 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl opatrně odebrán. Zkumavky s peletem byly znovu zváženy. Požadovaná váha tkáně se pohybovala okolo 30 mg. Pokud se tak nepovedlo napoprvé, postup byl opakován. Zkumavka se správnou vahou byla určena k okamžité izolaci DNA. Zbytek homogenizované a centrifugované tkáně byl uložen ve zkumavkách do mrazícího boxu při -80 °C k případné pozdější potřebě.

## **Zpracování periferní krve**

Periferní krev pacientů po chirurgické resekci byla přivezena do laboratoře CNC v odběrové zkumavce s EDTA roztokem. Zkumavka byla ihned po přijetí uložena do lednice při 4 °C. Před začátkem zpracovávání byla zkumavka s krví inkubována 20 minut při pokojové teplotě. Při aseptické práci v laminárním boxu byla zkumavka pomalu promíchána v ruce a pomocí pipety bylo přeneseno 200  $\mu$ l periferní krve do 1ml zkumavky. Tato krev byla připravena pro protokol izolace DNA.

## **Izolace DNA z periferní krve**

Izolaci DNA z periferní krve byla prováděna dle pracovního protokolu komerčního kitu *QIAamp DNA Blood Mini kit* (Qiagen, Německo). Všechny centrifugační kroky probíhaly při pokojové teplotě. Po každém centrifugačním kroku bylo provedeno krátké stočení vzorku. Koncentrace a čistota izolované DNA byla ověřena pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Dalším krokem ověření kvality byla gelová elektroforéza. Na 1% agarózový gel bylo nanášeno 80 ng izolované DNA smíchanou s nanášecím pufrem (2  $\mu$ l). Kontrola byla zajištěna molekulárním žebříkem, kterého bylo nanášeno množství 3  $\mu$ l. Elektroforéza probíhala po dobu jedné hodiny při napětí 5V/cm.

### **Laboratorní postup:**

- Do zkumavky s 200  $\mu$ l periferní krve bylo pomocí pipety přidáno 200  $\mu$ l AL pufru a 20  $\mu$ l Proteinázy K.
- Zkumavka byla promíchána pomocí vortexu, krátce stočena a přenesena do třepacího termobloku (Eppendorf) na dobu 10 minut při 56 °C a mírném třepání.
- Po inkubaci byla zkumavka krátce stočena pro odstranění kapek z víčka a bylo přidáno 200  $\mu$ l absolutního ethanolu.
- Zkumavka byla protřepána na vortexu a celý obsah zkumavky přenesen do sterilní kolonky.
- Kolonka byla vložena do centrifugy na 1 min/6000 x g. Po centrifugaci byla kolonka přesunuta do nové odpadní zkumavky.
- Do kolonky bylo přidáno 500  $\mu$ l odmývacího pufru AW1.
- Kolonka byla vložena do centrifugy na 1 min/6000 x g. Po centrifugaci byla kolonka znovu přesunuta do nové odpadní zkumavky.
- Do kolonky bylo přidáno 500  $\mu$ l odmývacího pufru AW2.
- Kolonka byla umístěna do centrifugy na 3 minuty při 20 000 x g. Po centrifugaci byl odmytého pufru vyprázdněn z odpadní zkumavky a byl proveden centrifugační krok na ‚sucho‘ na 3 min/ 20 000 x g.
- Kolonka byla přenesena do sterilní eluční zkumavky a bylo přidáno 55  $\mu$ l elučního roztoku AE. Inkubace probíhala 5 minut při pokojové teplotě.
- Po inkubaci byla kolonka umístěna do centrifugy na 1min/6 000 x g.

### **Izolace DNA z homogenizované nádorové mozkové tkáně**

Izolace DNA z nádorové tkáně byla prováděna pomocí komerčního kitu s názvem *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Německo). Všechny centrifugační kroky probíhaly při pokojové teplotě. Po veškerých inkubačních krocích bylo provedeno vždy krátké stočení zkumavky. Koncentrace izolované DNA byla ověřena pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) a fluorescenčního spektrofotometru Qubit (Invitrogen).

### **Laboratorní postup:**

- Do zkumavky s homogenátem bylo přidáno 100 µl ATL pufru a 20 µl proteinázy K.
- Zkumavku byla protřepána na vortexu a špičkou pipety byl obsah promíchán pro rozmělnění peletu.
- Zkumavka byla umístěna do třepacího termobloku na noc při 56 °C a mírném třepání.
- Do zkumavky byly přidány 4 µl RNázy A, byla protřepána na vortexu a ponechána inkubovat po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
- Ke vzorku bylo přidáno 200 µl AL pufru a vzorek byl ponechán inkubovat po dobu 10 minut při 70 °C.
- Ke vzorku bylo pomocí pipety přidáno 200 µl absolutního ethanolu a zkumavka byla protřepána na vortexu po dobu 15 vteřin a krátce stočena.
- Veškerá směs se vzorkem byla opatrně pomocí pipety přesunuta do *QIAamp Mini spin* kolonky vložené do 2ml sběrací zkumavky.
- Sběrací zkumavka s kolonkou byla umístěna do centrifugy na 1 min/6000 x g a po stočení byla kolonka vložena do nové čisté sběrací 2ml zkumavky.
- Do kolonky bylo přidáno 500 µl odmývacího pufru AW1. Centrifugační krok na 1 minutu při 6 000 x g byl zopakován.
- Znovu byla kolonka přenesena do čisté sběrací 2ml zkumavky a bylo přidáno 500 µl odmývacího pufru AW2.
- Kolonka byla umístěna do centrifugy na 3 minuty při 20 000 x g.
- Po centrifugaci byla kolonka znovu umístěna do nové sterilní sběrací zkumavky a centrifugační krok byl zopakován ‚na sucho‘ na 1 minutu při 20 000 x g.
- Po centrifugaci byla kolonka přemístěna do čisté 1,5ml zkumavky
- Do kolonky bylo pomocí pipety přidáno 55 µl elučního AE pufru a ponecháno inkubovat po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
- Po inkubaci byla kolonka vložena do centrifugy na 1 minutu při 6 000 x g.
- V případě potřeby (nedostatečná koncentrace DNA) byly eluční kroky opakovány.

### **Příprava buněčné suspenze**

V případě, že byl dostupný materiál z mozkové tkáně, byla připravena buněčná tkáň pro I-FISH analýzu.

### **Laboratorní postup:**

- Homogenizovaná tkáň byla přenesena do centrifugačních zkumavek a doplněna kultivačním médiem na maximální objem 6 ml.
- Do zkumavek bylo přidáno 100 µl kolcemidu pro zastavení buněčného dělení v metafázi.
- Zkumavky byly umístěny do sklízecího automatu HANABI-PII Plus Metaphase Chromosome Harvester na sklízecí program s těmito kroky:
  1. Kultivace s kolcemidem po dobu 1 hodiny, centrifugace a odsátí supernatantu.
  2. Přidání 5 ml hypotonického roztoku (0,075 M KCl), inkubace 20 minut, centrifugace a odsátí supernatantu. Hypotonie způsobí zvětšení objemu buněk, popraskání buněčných membrán.
  3. Přidání 5 ml směsi hypotonického roztoku a fixačního roztoku (methanol a kyselina octová v poměru 3:1), inkubace 5 minut, centrifugace a odsátí supernatantu.
  4. Přidání 5 ml fixačního roztoku, inkubace 5 minut, centrifugace a odsátí supernatantu.
  5. Fixace a centrifugace opakovaná 5krát pro kompletní odstranění buněčných struktur.
- V tomto kroce bylo možné zpracovanou mozkovou tkáň uložit v lednici při teplotě 4–7 °C do dalšího dne.
- Zkumavky byly umístěny do centrifugy po dobu 5 minut při 2 000 rpm.
- Byla odebrána větší část supernatantu a zbytek supernatantu promíchán s peletou.
- Vzorek byl doplněn fixačním roztokem do požadované hustoty pro přístroj HANABI PVI Metaphase Spreader, který provedl optimální rozprostření buněčné suspenze na preparát. S pomocí přístroje bylo nakapáno 100 µl připravené buněčné suspenze na podložní sklo a ponecháno usušit.
- Hustota jader a množství metafází bylo kontrolováno pod světelným mikroskopem.
- Pro „ostaršení“ preparátu pro okamžitou I-FISH analýzu bylo možné preparáty inkubovat na histologické plotýnce při 70 °C po dobu 20 minut, následně v 0,2 N roztoku HCl po dobu 5 minut a potom v kyvetě s 2x SSC při 60 °C po dobu 20 minut. V jiných případech bylo možné skla ponechat až 1 týden při pokojové teplotě dostatečně uschnout.

## I-FISH

Po nakapání buněčné suspenze nádorové mozkové tkáně na skla byla provedena hybridizace se značenými sondami.

### Laboratorní postup:

- Skla s nanesenou buněčnou suspenzí byly umístěny do kyvety s 2xSSC a ta vložena do tepelné lázně na dobu 20 minut při 37 °C.
- Po inkubaci byly vzorky dehydratovány ve vzestupné alkoholové řadě (70%, 85%, 95% etanol) vždy po 2 minutách. Takto připravená skla byla ponechána uschnout.
- LSI sondy byly po vyjmutí z mrazáku inkubovány při pokojové teplotě. Sonden firmy MetaSystems byly připravené k použití a bylo jich používáno množství 7 µl na vzorek. Sonden firmy Abbott Molecular bylo potřeba naředit. Pro tyto sondy byly připraveny hybridizační směsi: 0,5 µl sondy + 2 µl dH<sub>2</sub>O + 7 µl hybridizačního LSI pufru na vzorek.
- Na histologickou plotnu předehřátou na 42 °C byly rozloženy krycí skla o velikosti 22x22 mm.
- Na krycí skla bylo pomocí pipety přeneseno potřebné množství sondy nebo hybridizační směsi.
- Následně byla krycí skla přiložena na preparát se vzorkem. Případné bubliny byly vytlačeny.
- Po celém obvodu krycích skel byl nanesen rubbercement, aby při hybridizaci nedošlo k vypaření hybridizační směsi.
- Diamantovým perem byly označeny okraje krycích skel na druhé straně skla preparátu pro lepší orientaci při analýze fluorescenčním mikroskopem.
- Skla byla umístěna do automatického hybridizačního bloku (HYBride, TermoBrite, Abbott Molecular) společně s navlhčenou buničinou.
- Hybridizace probíhala při programu doporučeném výrobcem pro konkrétní sondy:
  - MetaSystems: denaturace při 75 °C/2 min, hybridizace při 37 °C/přes noc
  - Abbott Molecular: denaturace při 73 °C/2 min, hybridizace při 42 °C/přes noc
- Druhý den po hybridizaci byla skla z hybridizačního bloku vyjmuta, rubbercement a krycí skla byla odstraněna pomocí pinzety.

- Skla byly vloženy do speciální kyvety a ta do přístroje na odmývání VP 2000 Processor (Abott Molecular) na přednastavený program s těmito kroky:
  1. 2 min/73 °C/ 0,4×SSC + 0,3% NP-40
  2. 1 min/pokojová teplota/ 2×SSC/0,1% NP-40
  3. 2 min v každém kroku/vzestupná alkoholová řada (70%, 85%, 95% ethanol)
- Odmyté preparáty byly ponechány uschnout ve tmě na plotýnce předeřtávané na 42 °C.
- Na preparáty bylo pomocí pipety nanášeno 25 µl směsi DAPI/Antifade a bylo přiloženo krycí sklo o velikosti 22 x 60 mm. Případné bubliny byly vytlačeny.
- Preparáty byly umístěny v tmavé krabičce do mrazáku.

### **Analýza ve fluorescenčním mikroskopu**

Pro vyhodnocení preparátu byl používán fluorescenční mikroskop Axio Imager 1 (Carl Zeiss). Společně s druhým nezávislým pozorovatelem bylo hodnoceno 200 interfázních jader na každou sondu při zvětšení 1000x s pomocí imerzního oleje. Pro patologické nálezy byla určena tzv. hranice cut-off stanovena na 2,5% buněk pro amplifikace a nadpočetné chromosomy a 5% pro delece a monozomie (Zemanová et al. 2006).

### **Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)**

MLPA je výzkumná a diagnostická molekulární metoda relativní kvantifikace a detekce DNA sekvencí vyvinutá firmou MRC Holland (Nizozemsko) pro zjišťování změn počtu kopií asociovaných s onemocněními (MRC Holland©). Změny v počtu kopií dokáže detekovat jak na celých chromozomech, tak v jednotlivých exonech. Může být také použita pro zjišťování změn v metylaci DNA (MS-MLPA). Směs sond pro MS-MLPA obsahuje navíc metylačně specifické sondy, které cílí na DNA sekvence obsahující restrikční místo pro enzym HhaI.

Před použitím veškerých MLPA směsí a pufrů byly zkumavky důkladně protřepány na vortexu. Zkumavky s enzymy třepány nikdy nebyly. Připravené reakční směsi s enzymy byly promíchány pomocí pipety nasátím nahoru a dolů. Zkumavku s ligázou-65 a polymerázou byly po vyjmutí z mrazáku podrženy v dlani po dobu 10 vteřin.

#### **Laboratorní postup:**

- Do 0,2ml zkumavek bylo přidáno 5 µl vzorku DNA (optimum je 50-100 ng DNA) nebo TE pufr, pokud se jednalo o no-DNA negativní kontrolu a byly řádně označeny. Zde

byla použita DNA izolovaná jak z mozkové tkáně, tak z periferní krve pacientů jako referenční vzorky s předpokládaným normálním počtem kopií sekvencí detekovaných cílovými sondami.

- Zkumavky byly umístěny do termocykleru na denaturační program:
  1. 98 °C/5 minut
  2. 25 °C/pauza
- Po ujištění, že vzorky mají teplotu 25 °C, byly zkumavky vyjmuty z termocykleru.
- Byla připravena hybridizační směs a pomocí vortexu a pipety promíchána:
  - 1,5 µl MLPA pufru + 1,5 µl směsi sond/reakci
- Po denuraci bylo do každé zkumavky přidáno 3 µl hybridizační směsi a pipetou promícháno.
- Zkumavky byly umístěny do termocykleru na tento program:
  1. 95 °C/1 minuta
  2. 60 °C/16-20 hodin
- Byla připravena ligační směs a promíchána pipetou:
  - 25 µl ddH<sub>2</sub>O + 3 µl ligázového pufru A + 3 µl ligázového pufru B + 1 µl ligázy-65/reakci
- Po hybridizační reakci byl termocykler přepnut na ligační program:
  1. 54 °C/pauza
  2. 54 °C/15 minut
  3. 98 °C/5 minut
  4. 20 °C/pauza
- V momentě, kdy termocykler dosáhl teploty 54 °C, do každé zkumavky bylo přidáno 32 µl ligační směsi. Vzorky nebyly při tomto korku vytaženy z termocykleru. Vše bylo důkladně promícháno pipetou a byl zapnut ligační program od kroku dvě.
- Byla připravena polymerázová reakční směs:
  - 7,5 µl ddH<sub>2</sub>O + 2 µl SALSA PCR směsi primerů + 0,5 polymerázy/reakci
- Zkumavky byly vyjmuty z termocykleru a při pokojové teplotě bylo ke každému vzorku přidáno 10 µl polymerázové směsi a následně promícháno pipetou.
- Zkumavky s polymerázou byly vloženy zpět do termocykleru na PCR program:
  1. 35 cyklů: 95 °C/30 vteřin; 60 °C/30 vteřin; 72 °C/60 vteřin
  2. 72 °C/20 minut



### 3. 15 °C/pauza

- Po PCR reakci byly PCR produkty připraveny na fragmentační analýzu. Bylo možné je uskladnit po dobu 1 týdne v -4 °C, popřípadě déle při -20 °C.

## **Fragmentační analýza**

Práce byla vykonávána v laminárním boxu, který byl před začátkem ošetřen UV světlem. Při veškerém přidávání vzorků byl vzorek dvakrát promíchán pomocí pipety nasátím nahoru a dolů.

### **Laboratorní postup:**

- Dle množství vzorků bylo pomocí pipety přidáno 12 µl formamidu a 0,3 µl LIZ velikostního standardu na vzorek do požadovaného počtu jamek 96jankové destičky.
- Do každé jamky bylo přidáno 0,8 µl PCR produktu.
- Destička byla umístěna do termobloku na dobu 3 minut při 86 °C.
- Po vyjmutí z termobloku byla destička umístěna do lednice na dobu 2 minut při -4 °C.
- Destička byla po stočení následně vložena do sekvenátoru SeqStudio (ThermoFisher Scientific) na příslušný program:
  - proud: 1,6 kV
  - čas: 12 vteřin
  - doba runu: 1 600 vteřin
  - proud při runu: 19,5 kV
  - set barviv: G5
  - teplota: 60 °C
- Získána data ve formátu .fsa byla analyzována pomocí programu Coffalyser.Net

## **Metylačně specifická (MS) MLPA**

Při přípravě všech reakčních směsí byla směs vždy po přidání posledního objemu promíchána pomocí pipety. Totéž bylo prováděno při přenášení směsi ke vzorku.

### **Laboratorní postup:**

- Pro každý zkoumaný vzorek, referenční vzorek, pozitivní kontrolu a negativní kontrolu byla připravena 0,2ml zkumavku.
- Do každé zkumavky byl přidán vzorek izolované DNA ve vypočítaném objemu na 70 ng/µl a doplněn TE pufrem.

- Všechny zkumavky byly umístěny do termocykleru na denaturační program:
  1. 98 °C/5 minut
  2. 25 °C/pauza
- Byla připravena hybridizační směs: 1,5 µl MLPA pufru + 1,5 µl směsi sond/vzorek
- Zkumavky byly z termocykleru vyjmuty a ke každému vzorku byly přidány 3 µl hybridizační směsi.
- Zkumavky byly umístěny zpět do termocykleru na hybridizační program:
  1. 95 °C/1 minuta
  2. 60 °C/16-20 hodin
  3. 20 °C/pauza
- Byly připraveny tři různé ligační směsi:
  - Ligační směs A: 3 u ligačního pufru A + 10 µl ddH<sub>2</sub>O/vzorek.
  - Ligázová směs: 8,25 µl ddH<sub>2</sub>O + 1,5 µl ligačního pufru B + 0,25 enzymu ligáza-65/ vzorek
  - Ligačně-trávicí směs: 7,75 µl ddH<sub>2</sub>O + 1,5 µl ligačního pufru B + 0,25 µl enzymu ligáza-65 + 0,5 µl enzymu SALSA HhaI
- Zkumavky byly vyjmuty z termocykleru, který byl ponechán při 20 °C.
- Do každé zkumavky bylo přidáno 13 µl ligační směsi A. Byl připraven nový soubor zkumavek a z každé reakce bylo pomocí pipety přeneseno 10 µl objemu do řádně označené odpovídající druhé zkumavky. Původní řada zkumavek byla značena jako první MLPA reakce a druhá jako druhá MLPA reakce.
- Všechny zkumavky byly umístěny do termocykleru na 48 °C.
- Jakmile termocykler dosáhnul 48 °C, zkumavky byly ponechány uvnitř a bylo přidáno 10 µl ligázové směsi do každé zkumavky první MLPA reakce. Do každé zkumavky druhé MLPA reakce bylo přidáno 10 µl ligačně-trávicí směsi.
- Na termocykleru byl spuštěn ligační program:
  1. 48 °C/30 minut
  2. 98 °C/5 minut
  3. 20 °C/pauza
- Byla připravena polymerační směs: 3,75 µl ddH<sub>2</sub>O + 1 µl SALSA PCR směsi primerů + 0,25 µl SALSA polymerázy.

- Při pokojové teplotě bylo přidáno 5  $\mu$ l polymerační směsi do každé směsi (první i druhé MLPA reakce). Zkumavky byly okamžitě umístěny do termocykleru na PCR program:
  1. 35 cyklů: 95 °C/30 vteřin; 60 °C/30 vteřin; 72 °C/60 vteřin
  2. 72 °C/20 minut
  3. 15 °C/pauza
- Fragmentační analýza probíhala dle stejného protokolu jako při metodě MLPA.

### **aCGH/SNP**

Čipová technologie celogenomové hybridizace spojená s analýzou polymorfismů neboli aCGH/SNP představuje moderní a výkonnou metodu pro analýzu genomických aberací. Tato technologie umožňuje současné vyšetření rozsáhlých oblastí genomu za účelem detekce změn v počtu kopií DNA a identifikace jednonukleotidových polymorfismů (SNP). aCGH/SNP umožňuje detailní mapování genomických aberací, které mohou být spojeny s různými onemocněními, včetně rakoviny a jiných genetických poruch. Díky své vysoké rozlišovací schopnosti a přesnosti je tato technologie nepostradatelným nástrojem v molekulární diagnostice.

aCGH/SNP byla prováděna pomocí komerčního kitu a komerčních reagensů firmy Agilent Technologies. Kromě detekce změn v počtech kopií DNA sekvencí tato metoda umožnila analýzu SNP a oblastí s absencí heterozygotnosti bez změny počtu kopií DNA sekvencí neboli uniparentální dizomie (UPD).

### **Laboratorní postup:**

#### **1. DEN: Štěpení**

- Pro každý vzorek izolované DNA byl vypočítán potřebný objem, aby se množství DNA v reakci, co nejlépe přibližovalo 1000 ng. Stejný výpočet byl proveden pro komerčně dodané referenční DNA, jejichž koncentrace byla srovnána s přiřazeným vzorkem DNA. V případě potřeby byla referenční DNA ředěna ddH<sub>2</sub>O.
- Vypočítané objemy vzorků DNA i referencí byly přeneseny do zkumavek.
- Na ledu byla připravena štěpící směs: (objemy odpovídají 8 reakcím, tzn. 1 čipu)
  - 17  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
  - 22,1  $\mu$ l 10x RE pufr

- 1,7  $\mu$ l BSA
- 4,25  $\mu$ l enzymu AluI
- 4,25 enzymu RsaI
- Ke každé zkumavce bylo přidáno 5,8  $\mu$ l štěpící směsi a následně byly vloženy do tepelné lázně po dobu 2 hodin při 37 °C.
- Zkumavky byly umístěny do termobloku po dobu 20 minut při 65 °C pro zastavení štěpící reakce.
- Po inhibici reakce byly zkumavky umístěny na led na 5 minut.
- Výsledek štěpení byl ověřen nanesením 2  $\mu$ l analyzované a referenční DNA společně se 2  $\mu$ l nanášecího pufru na 1% agarózový gel. Elektroforéza byla spuštěna na program:
  - 5 minut/60 V
  - 50 minut/90 V

## **2. DEN: značení**

- Do každé reakční zkumavky bylo přidáno 5  $\mu$ l Random Primeru a zkumavky byly umístěny do termobloku na dobu 3 minut při 98 °C.
- Po inkubaci byly zkumavky přeneseny na led po dobu 5 minut.
- Byla připravena značící směs: (objemy odpovídají 4 reakcím, tzn. 4 analyzovaným DNA vzorkům nebo 4 referenčním DNA vzorkům)
  - 8,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
  - 42,5  $\mu$ l gDNA pufr
  - 21,35 dNTP
  - 12,75  $\mu$ l barvy Cy3 pro vzorky analyzované DNA nebo Cy5 pro reference
  - 4,25  $\mu$ l enzymu ExoKlenow
- Do každé zkumavky bylo přidáno 21  $\mu$ l značící směsi příslušné barvy a zkumavky byly ponechány inkubovat v termobloku po dobu 2 hodin při 37 °C.
- Následně byly zkumavky umístěny do termobloku po dobu 10 minut při 65 °C pro zastavení aktivity polymerázy a po inkubaci byly zkumavky umístěny na led.
- Pro přečištění značené DNA byl využit komerční kit SureTag DNA Labelling Kit (Agilent Technologies).
- Do každé zkumavky bylo přidáno 430  $\mu$ l TE pufru.

- Celý objem každé zkumavky byl přenesen na purifikační kolonku vloženou do 2ml sběrné zkumavky.
- Zkumavky byly vloženy do centrifugy na 10 minut při 14 000g.
- Eluáty byly vyhozeny a do každé zkumavky bylo přidáno 480  $\mu$ l TE pufru. Zkumavky byly umístěny zpět do centrifugy na 10 minut při 14 000 g.
- Eluáty byly znovu vyhozeny a kolonky byly umístěny dnem vzhůru do nové sběrné zkumavky.
- Zkumavky byly umístěny do centrifugy na dobu 1 minutu při 1000 g.
- Výsledný objem přečištěné gDNA byl ideálně v rozmezí 22 – 24  $\mu$ l. Pokud tak nebylo, objemy byly opdařovány na požadovaný objem ve vakuové odparce.
- Pomocí spektrofotometru (NanoQuant Infinite M200 Microplate Reader, Tecan) byla ověřena míra inkorporace fluorescenční barvy do vzorku. Díky zjištěné absorbanci byla vypočtena specifická aktivita značených vzorků (specifická aktivita = pmol/ $\mu$ l; fluorescenční barvivo/ $\mu$ g na  $\mu$ l gDNA).

### **3. DEN: hybridizace**

- Bylo přeneseno 20  $\mu$ l fluorescenčně značené DNA každého vyšetřovaného vzorku do nové zkumavky a přidáno dané množství fluorescenčně značené referenční DNA do konečného objemu 40  $\mu$ l.
- Do každé zkumavky bylo přidáno 5,5  $\mu$ l Cot-1 DNA + 11,5  $\mu$ l aCGH blokovacího činidla + 60  $\mu$ l HI-RPM hybridizačního pufru.
- Zkumavky byly umístěny do termobloku na program:
  1. 3 min/98 °C
  2. 30 min/37 °C
- Těsnící sklíčko (gasket slide) bylo umístěno do hybridizační komůrky Agilent SureHyb (Agilent Technologies).
- Celý objem každé hybridizační směsi vzorku a referenční DNA byl přenesen na příslušné vyznačené místo na sklíčku. Na těsnící sklíčko byl umístěn aktivní stranou mikročip *SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray* (Agilent Technologies). Hybridizační komůrku byla uzavřena.
- Komůrku byla přenesena do hybridizační pece Microarray Hybridization Oven (Agilent Technologies) na dobu 22 hodin při 67 °C a rychlosti otáčení 20 rpm.

#### 4. DEN: skenování

- Byly připraveny promývací pufry:
  - pufr 1 do dvou kyvet o teplotě 20-22 °C
  - pufr 2 v jedné kyvetě o teplotě 37 °C
- Hybridizační komůrka byla otevřena pod hladinou promývacího pufru 1, mikročip byl z těsnícího sklíčka odstraněn a vložen do druhé kyvety promývacího pufru 1 po dobu 5 minut.
- Následně byl mikročip přenesen do promývacího pufru 2 po dobu 1 minuty při 37 °C.
- Z promývacího pufru 2 byl mikročip přesunut do skeneru SureScan Dx Microarray Scanner (Agilent Technologies). Skenování probíhalo na Ústavu biologie a lékařské genetiky (Purkyňův ústav, Albertov 4, Praha).
- Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu Agilent Cytogenomics (Agilent Technologies).

## 9. Výsledky

Do vyšetřovaného souboru byla zařazeni pacienti, kteří splňovali následující kritéria: 1) histologicky potvrzená diagnóza difúzního gliomu s nejméně dvěma chirurgickými odběry nádorové tkáně, 2) dostatek materiálu v archivu laboratoře CNC VFN a 1. LF UK. Jednalo se buď o archivovanou nádorovou tkáň, fixovanou buněčnou suspenzi nebo již izolovanou DNA z nádorové tkáně. Mezi lety 2004 a 2023 tyto parametry splnilo 26 pacientů. Pacienti byli rozděleni do tří skupiny dle histologické diagnózy při prvním odběru. Základní klinická data těchto pacientů ukazuje **Tab. 3**. Soubor obsahuje 13 žen a 13 mužů s mediánem věku 42,5 let (rozmezí 27-76 let). Nejčastější věkovou skupinou byli pacienti do 60 let věku. Celkem bylo analyzováno 15 pacientů s astrocytárním tumorem, čtyři pacienti s oligodendroglíálním tumorem a sedm pacientů s primárním glioblastomem. Zastoupení základních subtypů difúzních gliomů a věkové rozdělení souboru pacientů ukazují **Obr. 9** a **10**.

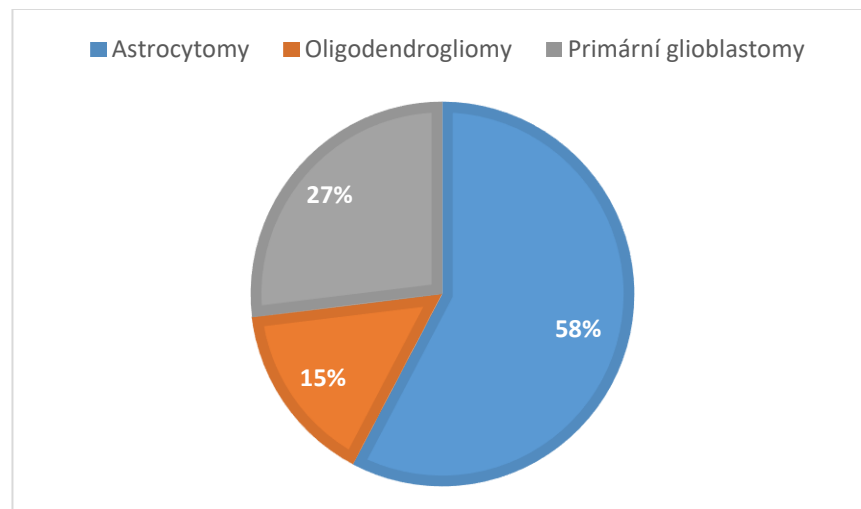
ID	Pohlaví	Věk v době vyšetření	Histologická diagnóza	Grade
<b>Astrocytomy</b>				
<b>1A</b>	Žena	27	Fibrilární astrocytom	2
<b>1B</b>		37	Anaplastický astrocytom	3
<b>2A</b>	Žena	50	Difúzní astrocytom	2
<b>2B</b>		56	Sekundární glioblastom	4
<b>2C</b>		59	Difúzní astrocytom	2
<b>3A</b>	Muž	32	Gemistocytární astrocytom	2
<b>3B</b>		38	Difúzní astrocytom	2
<b>3C</b>		39	Anaplastický astrocytom	3
<b>3D</b>		40	Sekundární glioblastom	4
<b>4A</b>	Žena	36	Anaplastický astrocytom	3
<b>4B</b>		37	Anaplastický astrocytom	3
<b>6A</b>	Muž	56	Anaplastický astrocytom	3
<b>6B</b>		58	Glioblastom, <i>IDH</i> - wt	4
<b>7A</b>	Žena	35	Difúzní astrocytom	2
<b>7B</b>		39	Anaplastický oligoastrocytom	3
<b>8A</b>	Muž	43	Difúzní astrocytom	2
<b>8B</b>		48	Anaplastický astrocytom	3
<b>9A</b>	Muž	33	Difúzní astrocytom	2

<b>9B</b>		38	Difúzní astrocytom	2
<b>10A</b>	Žena	27	Difúzní astrocytom	2
<b>10B</b>		30	Difúzní astrocytom	2
<b>10C</b>		32	Anaplastický astrocytom	3
<b>14A</b>	Žena	76	Difúzní astrocytom	2
<b>14B</b>		77	Glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>19A</b>	Muž	42	Anaplastický astrocytom	3
<b>19B</b>		43	Anaplastický astrocytom	3
<b>19C</b>		44	Glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>20A</b>	Muž	39	Difúzní astrocytom	2
<b>20B</b>		41	Difúzní astrocytom	2
<b>24A</b>	Žena	40	Difúzní astrocytom	2
<b>24B</b>		43	Anaplastický astrocytom	3
<b>25A</b>	Muž	33	Difúzní astrocytom	2
<b>25B</b>		39	Sekundární glioblastom, <i>IDH</i> -mutovaný	4
<b>26A</b>	Žena	32	Difúzní astrocytom	2
<b>26B</b>		33	Anaplastický astrocytom	3
<b>Oligodendrogliomy</b>				
<b>5A</b>	Žena	68	Anaplastický oligodendrogliom	3
<b>5B</b>		68	Glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>13A</b>	Žena	52	Oligoastrocytom	2
<b>13B</b>		56	Anaplastický oligodendrogliom	3
<b>18A</b>	Žena	30	Oligodendrogliom	2
<b>18B</b>		32	Oligodendrogliom	2
<b>23A</b>	Muž	42	Oligodendrogliom	2
<b>23B</b>		48	Anaplastický oligodendrogliom	3
<b>Primární glioblastomy</b>				
<b>11A</b>	Muž	53	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>11B</b>	Muž	53	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>12A</b>	Muž	53	Glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>12B</b>		54	Difúzní astrocytom	2
<b>15A</b>	Muž	50	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>15B</b>		51	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>16A</b>	Žena	65	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>16B</b>		66	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>17A</b>	Žena	58	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4

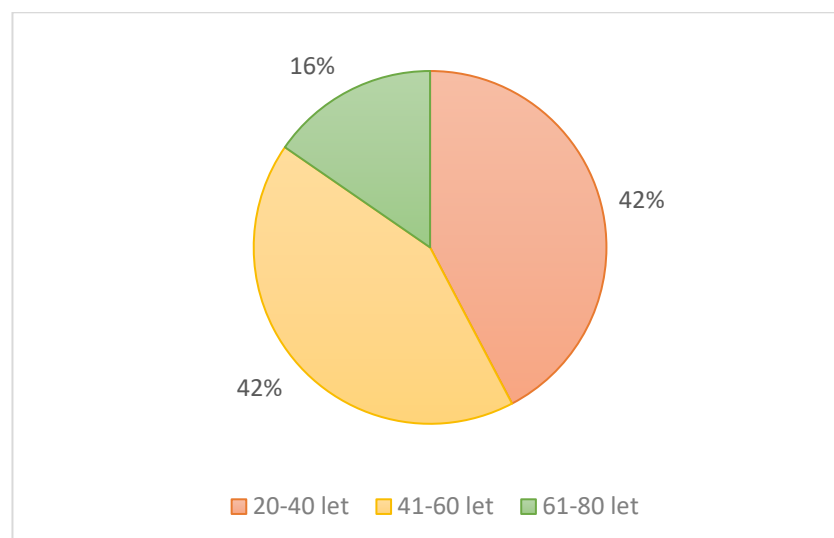


<b>17B</b>		60	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>21A</b>	Muž	75	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>21B</b>		75	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>22A</b>	Muž	60	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4
<b>22B</b>		61	Primární glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4

**Tabulka 3: Seznam pacientů se základními klinickými údaji.** Rozdělení na 3 základní subtypy na základě diagnózy v době prvního odběru. Pacient je označen číslem a písmena A-D označují jednotlivé odběry v chronologickém pořadí. Přípona *IDH*-wt označuje nález bez mutace *IDH1* genu.



**Obrázek 9: Procentuální zastoupení subtypů difúzních gliomů ve vyšetřovaném souboru.** Rozdělení do skupin bylo provedeno na základě diagnózy v době prvního odběru.



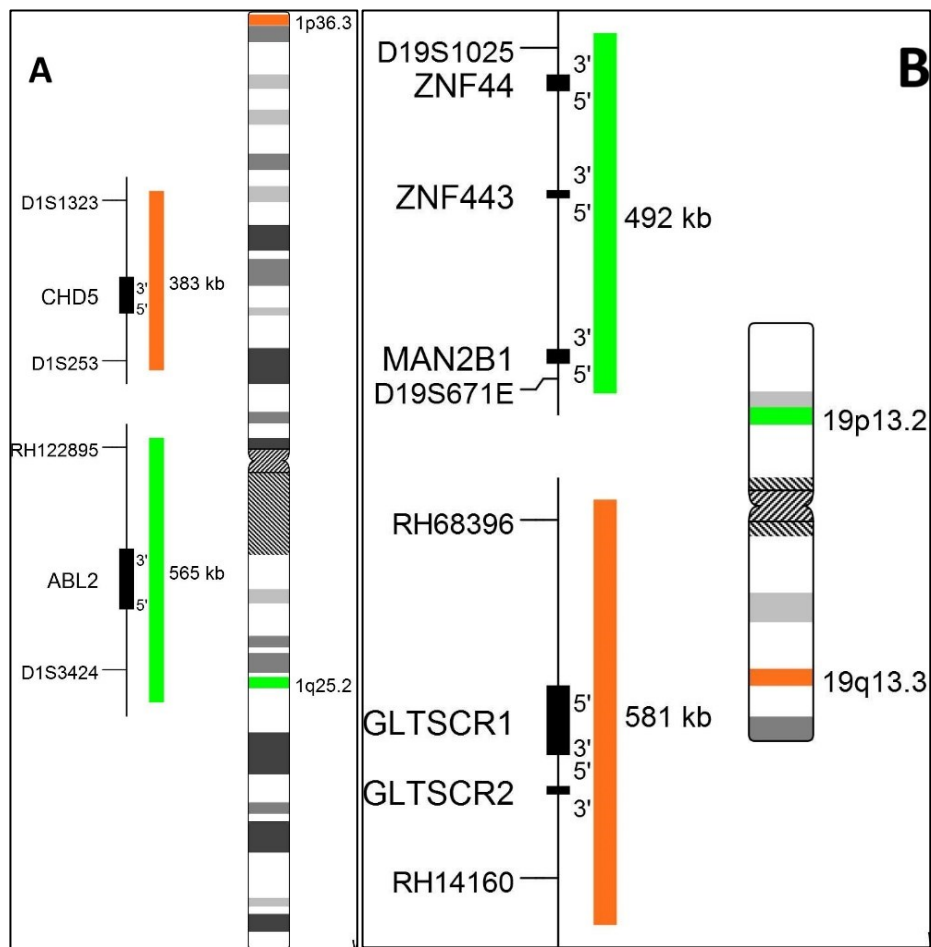
**Obrázek 10: Procentuální zastoupení věkových rozmezí ve vyšetřovaném souboru.** Věk v době prvního odběru.

## Výsledky I-FISH

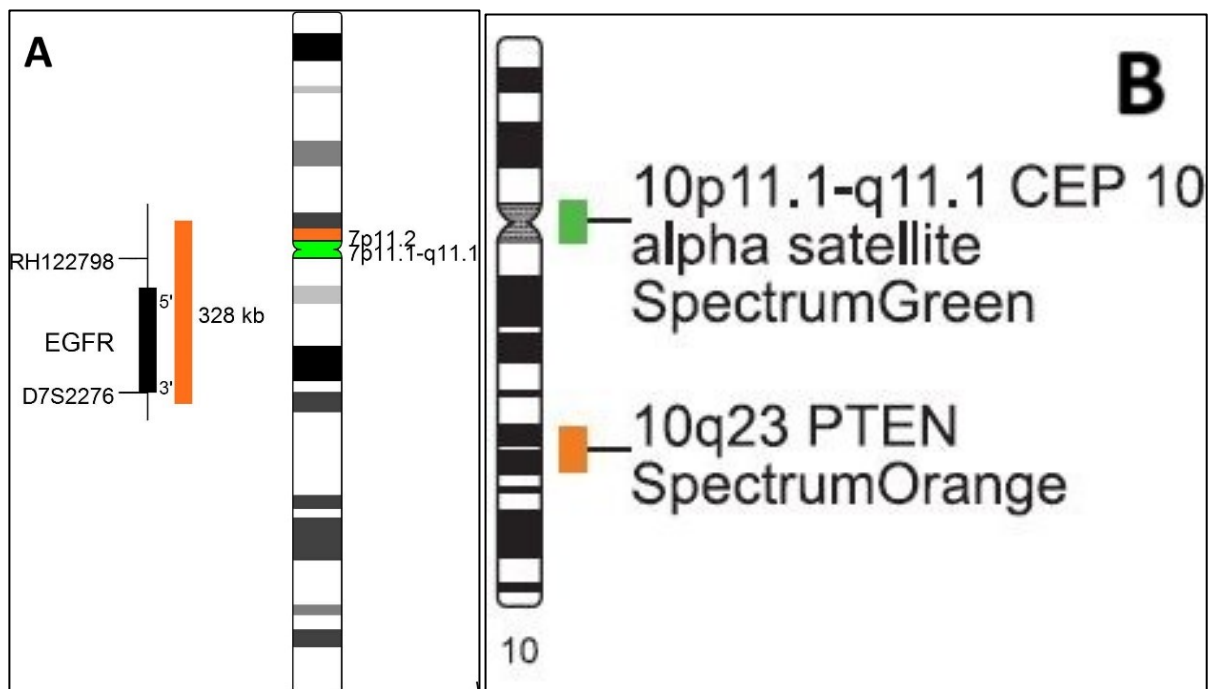
U všech 26 pacientů (tj. u 57 vzorků nádorové tkáně) bylo provedeno vyšetření I-FISH s využitím základního gliomového panelu. Panel se skládá z lokus specifických a centromerických DNA sond pro detekci nejčastějších chromozomových aberací gliomů. V panelu se nachází čtyři sondy, viz **Tab. 4**. Pro některé pacienty byly již výsledky celého nebo částečného panelu dostupné a pro 32 vzorků byla provedena I-FISH zbývajících sond z archivovaného materiálu. **Obr. 11** a **12** ukazují schématické znázornění jednotlivých DNA sond v použitém gliomovém panelu. **Obr. 13** ukazuje příklady patologických nálezů některých DNA sond.

Název sondy	Výrobce	Cílová oblast
<b>XL 1p36/1q25 del</b>	MetaSystems©	<i>CHD5</i> lokus 1p36 (383 kb) – červený signál <i>ABL2</i> lokus 1q25 (565 kb) – zelený signál
<b>XL 19p/19q del</b>	MetaSystems©	<i>GLTSCR1</i> a <i>GLTSCR2</i> lokusy 19q13 (581 kb) – červený signál lokus 19p13 (492 kb) – zelený signál
<b>XL <i>EGFR</i> amp</b>	MetaSystems©	lokus 7p11.2 (328 kb) – červený signál lokus 7p11.1 - q11.1 – zelený signál
<b>LSI <i>PTEN</i> (10q23) / CEP 10 Dual Color Probe Set</b>	Abbott Molecular©	lokus 10q23 (368 kb) – červený signál centromerická oblast chromozomu 10 – zelený signál

Tabulka 4: Seznam lokus specifických a centromerických DNA sond zahrnutých v základním gliomovém panelu.



**Obrázek 11: Schéma znázorňující cílové oblasti sond na chromozomech 1 a 19. A:** Schéma ukazuje lokus specifickou sondou pro oblasti 1p36 (červená barva) a 1q25.2 (zelená barva). **B:** Schéma ukazuje lokus specifickou sondou pro oblasti 19p13.2 (zelená barva) a 19q13.3 (červená barva). Na pravé straně obrázku je vždy vyneseno ideogram daného chromozomu a vlevo od něj zvětšeny cílové oblasti s popisy lokusů. (Převzato z webu společnosti MetaSystems©)



**Obrázek 12: Schéma znázorňující cílové oblasti sond na chromozomech 7 a 10.** A: Schéma ukazuje sondu pro detekci amplifikace genu *EGFR* (7p11.2, červená barva) a centromery chromozomu 7 (7p11.1q11.1, zelená barva) od firmy MetaSystems©. Na pravé straně obrázku je vyneseno ideogram chromozomu 7 a vlevo od něj zvětšena cílová oblast s popisy lokusů. B: Schéma ukazuje sondu pro detekci genu *PTEN* (10q23, červená barva) a oblasti centromery chromozomu 10 (10p11.1q11.1, zelená barva) od firmy Abbott Molecular©. Zde je ideogram daného chromozomu na levé straně obrázku a barvy označují cílové oblasti. (Převzato z webu společnosti MetaSystems© a Abbott Molecular©)

Výsledky I-FISH vyšetřovaného souboru shrnuje **Tabulka 3**. Pro 7 vzorků (odběry 1A, 3D, 8B, 18A a 25A) nebylo možné provést analýzu z jednoho ze dvou důvodů: a) neúspěšná hybridizace sondy se vzorkem a zároveň nedostatek materiálu, b) nedostatek nádorových buněk v archivovaném vzorku. V **Tabulce 3** jsou tyto případy označeny jako ‚Neprovedeno‘.

ID	XL 1p36/1q25 del	XL 19p/19q del	XL <i>EGFR</i> amp	LSI <i>PTEN</i> / CEP 10
<b>Astrocytomy</b>				
1A	neprovedeno	neprovedeno	tetrazomie 7 (79,5%)	monozomie 10 (8%)/polyploidie (69%)
1B	polyploidie (17,5%)	polyploidie (20%)	polyploidie (52,5%)	polyploidie (61,5%)
2A	delece 1p36 (24%)	delece 19q13 (29,5%)	normální nález	normální nález
2B	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
2C	delece 1p36 (32,5%)	delece 19q13 (41,5%)	normální nález	normální nález
3A	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález

3B	normální nález	delece 19q13 (8,5%)	trizomie 7 (7%)	trizomie 10 (2,5%)
3C	normální nález	normální nález	trizomie (5,5%)	normální nález
3D	neprovedeno	neprovedeno	normální nález	normální nález
4A	delece 1p36 v tetraploidii (5 %)/polyploidie (5,5%)	delece 19q13 v polyploidii (17 %)	trizomie 7 (3,5%)/tetrazomie 7 (14,5 %)	polyploidie (17,5%)
4B	normální nález	normální nález	trizomie 7 (16 %)	normální nález
6A	delece 1p36 (75%)	trizomie 19 (67,5%)	trizomie 7 s amplifikací <i>EGFR</i> (61,5%)/amplifikace <i>EGFR</i> (16,5 %)	monozomie 10 (94,5%)
6B	normální nález	normální nález	trizomie 7 (16,5%)	monozomie 10 (19%)
7A	tetrazomie (10%)	tetrazomie (7,5%)	trizomie 7 (37,5%)	tetrazomie 10 (4%)
7B	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
8A	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
8B	normální nález	normální nález	neprovedeno	normální nález
9A	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
9B	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
10A	tetrazomie 1 (24%)	tetrazomie 19 (42,5%)	trizomie 7 (5%)/tetrazomie 7 (14,5%)	trizomie 10 (9%)/tetrazomie 10 (15%)
10B	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
10C	normální nález	normální nález	trizomie 7 (5%)	normální nález
14A	normální nález	tetrazomie 19 (7,5%)	trizomie 7 s amplifikací <i>EGFR</i> (54,5%)/amplifikace <i>EGFR</i> (13,5%)	monozomie 10 (56,5%)
14B	normální nález	normální nález	trizomie 7 s amplifikací <i>EGFR</i> (10,5%)	monozomie 10 (4,5%)
19A	normální nález	trizomie 19 (63%)	amplifikace <i>EGFR</i> (95%)	monozomie 10 (90%)
19B	tetrazomie 1 (11,5 %)	trizomie 19 (12,5 %)	amplifikace <i>EGFR</i> (25%)	monozomie 10 (15 %)
19C	normální nález	trizomie 19 (27,5 %)	amplifikace <i>EGFR</i> (45%)/tetrazomie 7 (2,5%)	monozomie 10 (40%)
20A	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález

20B	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
24A	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
24B	delece 1p36 (2,5%)/delece 1p36 v tetraploidii (2%)/tetrazomie 1 (5%)	tetrazomie 19 (2,5%)	tetrazomie (5%)	tetrazomie (6%)
25A	delece 1p36 (59,5%)	neprovedeno	normální nález	normální nález
25B	normální nález	normální nález	tetrazomie (6,5 %)	normální nález
26A	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
26B	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
<b>Oligodendrogliomy</b>				
5A	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
5B	normální nález	normální nález	trizomie 7 (5%)	normální nález
13A	delece 1p36 (6,5%)	delece 19q13 (6,5%)	normální nález	normální nález
13B	delece 1p36 (52%)/delece 1p36 v tetraploidii (3,5%)	delece 19q13 (68%)	normální nález	normální nález
18A	normální nález	normální nález	neprovedeno	normální nález
18B	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
23A	delece 1p36 (16,5%)	delece 19q13 (13,5%)	tetrazomie 7 (10%)	tetrazomie 10 (4%)
23B	delece 1p36 (17,5%)/delece 1p36 v tetraploidii (8,5%)	delece 19q13 (13%)/delece 19q13 v tetraploidii (11%)	normální nález	normální nález
<b>Primární glioblastomy</b>				
11A	delece 1q25 (41%)	trizomie 19 (55%)	trizomie 7 (44%)	monozomie 10 (71%)
11B	monozomie 1 (3%)	trizomie 19 (10%)	trizomie 7 (25%)	monozomie 10 s delecí <i>PTEN</i> (15%)/monozomie 10 (30%)
12A	normální nález	normální nález	trizomie 7 s amplifikací <i>EGFR</i> (9%)/amplifikace <i>EGFR</i> (2,5%)	monozomie 10 (9%)
12B	normální nález	normální nález	trizomie 7 (7%)/amplifikace <i>EGFR</i> (2,5%)	monozomie 10 (14%)

15A	normální nález	normální nález	amplifikace <i>EGFR</i> (75%)	monozomie 10 s bíalelickou delecí <i>PTEN</i> (18%)/monozomie 10 (59,5%)
15B	tetrazomie 1 (3%)	normální nález	trizomie 7 s amplifikací <i>EGFR</i> (13%)/amplifikace <i>EGFR</i> (60%)	monozomie 10 (45%)
16A	normální nález	trizomie 19 (5%)	trizomie 7 s amplifikací <i>EGFR</i> (46,5%)/amplifikace <i>EGFR</i> (43,5%)	monozomie 10 s bíalelickou delecí <i>PTEN</i> (7,5%)/monozomie 10 (81,5%)
16B	parciální trizomie 1q25 (24,5%)	trizomie 19 (25%)	trizomie 7 s amplifikací <i>EGFR</i> (38%)/amplifikace <i>EGFR</i> (15%)	monozomie 10 (42%)
17A	normální nález	trizomie 19 (20%)	trizomie 7 s amplifikací <i>EGFR</i> (80,5%)	monozomie 10 (46,5%)
17B	normální nález	normální nález	amplifikace <i>EGFR</i> (30%)	monozomie 10 (30%)
21A	normální nález	normální nález	trizomie 7 (2,5 %)	normální nález
21B	normální nález	normální nález	normální nález	normální nález
22A	tetrazomie 1 (3,5%)	tetrazomie 19 (6,5%)	trizomie 7 (2,5%)/amplifikace <i>EGFR</i> (20%)	monozomie 10 (5%)
22B	normální nález	normální nález	trizomie 7 (10%)/amplifikace <i>EGFR</i> (18%)	monozomie 10 (10%)/delece <i>PTEN</i> (5%)

**Tabulka 5: Souhrn patologických nálezů metodou I-FISH. V závorce je uvedena velikost klonu v procentech.**

## Astrocytomy

Celkem bylo metodou I-FISH vyšetřeno 15 nemocných s astrocytome, z toho čtyři nemocní disponovali třemi a více odběry (pacienti č.2, 3, 10 a 19). Patologický nález alespoň jedné z použitých DNA sondy byl prokázán v devíti diagnostických vzorcích. Pro opakované odběry byl patologický nález alespoň jedné z DNA sond u osmi nemocných.

Přítomnost polyploidních klonů nádorových buněk společně s dalšími chromozomálními změnami byla prokázána ve čtyřech diagnostických vzorcích (1A, 4A, 7A a 10A) a v jednom vzorku z opakovaného odběru (24B). V jednom diagnostickém vzorku (1B) byla nalezena polyploidie bez jiných chromozomálních změn. Za polyploidii byla považována detekce tří a více fluorescenčních signálů pro každou DNA sondu použitou na daný odběr.

Delece oblasti 1p36 byla detekována ve čtyřech diagnostických vzorcích (2A, 4A, 6A a 25A) a pouze ve dvou vzorcích z opakovaných odběrů (2C a 24B). U pacientů č.4, 6 a 25 klon s delecí oblasti 1p36 vymizel. Jedenkrát se klon s delecí 1p36 objevil poprvé až ve vzorku z opakovaného odběru, kdy nádor pacientky č.24 postoupil z difúzního astrocytomu druhého stupně na stupeň třetí. U dvou nemocných byla delece 1p36 detekována společně s delecí oblasti 19q13. Jednalo se o a diagnostický vzorek pacientky č.4. a dva odběry pacientky č.2.

Patologické nálezy detekovány sondou *XL 19p19q del* byly buď delece oblasti 19q13 (detekovány u tří pacientů v odběrech 2A, 2C, 3B a 4A) anebo trizomie chromozomu 19 (detekována u dvou pacientů v odběrech 6A, 19A, 19B a 19C). U pacienta č.6 klon s trizomií chromozomu 19 vymizel, i přes relativně velký původní klon v diagnostickém vzorku (67,5%). Taktéž klony s delecí oblasti 19q13 vymizely u opakovaných odběrů pacientů č.3 a 4. Zde byly původní klony velikostně menší, 8,5% a 17%.

Trizomie chromozomu 7 byla nalezena celkem pětkrát v diagnostických vzorcích (4A, 6A, 7A, 10A a 14A), z toho dvakrát (6A a 14A) v klonu současně s amplifikací *EGFR* genu. Ve vzorcích z opakovaných odběrů byla trizomie chromozomu 7 detekována šestkrát (3B, 3C, 4B, 6B, 10C a 14B), z toho jednou v klonu společně s amplifikací *EGFR* genu (14B). U pacienta č.3 se poprvé klon s trizomií 7 objevil až ve dvou opakovaných odběrech a při čtvrtém odběru nebyl znovu detekován. U pacientky č.7 klon s trizomií chromozomu 7 vymizel ve vzorku z opakovaného odběru, i přes postup onemocnění do gliomu vyššího řádu. Nádorové klony s amplifikací *EGFR* genu bez trizomie chromozomu 7 byly nalezeny pouze ve dvou diagnostických vzorcích (6A a 14A) a v jejich následujících odběrech tyto klony vymizely. U pacienta č. 19, jehož onemocnění postoupilo až do glioblastomu čtvrtého stupně, byla amplifikace *EGFR* genu detekována při všech odběrech.

Monozomie chromozomu 10 byla detekována ve čtyřech diagnostických vzorcích (1A, 6A, 14A a 19A). Znovu ve vzorcích z opakovaných odběrů byla detekována u pacientů č.6, 14 a 19. U



pacientky č.1 byl původní klon malý (8%) a při opakovaném odběru, kdy nádoru postoupil z gliomu druhého stupně na stupeň třetí, nebyl znova detekován. Sondou *LSI PTEN (10q23) / CEP 10* byla detekována také trizomie chromozomu 10 v nízkofrekvenčních klonech, a to v odběrech 3B a 10A. Oba odběry byly histologicky diagnostikovány jako difúzní astrocytomy druhého stupně.

## **Oligodendrogliomy**

Celkem byli vyšetřeni čtyři nemocní s oligodendrogliomem. Patologický nález alespoň jedné z použitých DNA sond byl prokázán ve dvou diagnostických vzorcích (13A a 23A) a ve třech vzorcích z opakovaných odběrů (5B, 13B a 23B). U této skupiny nemocných nebyla prokázána celková polyploidie, pouze polysomie jednotlivých chromozomů. Pacient č.18 vykazoval normální nález pro všechny čtyři sondy v diagnostickém i opakovaném vzorku (chybí informace o stavu chromozomu 7 pro odběr 18B, jelikož nebyla hybridizace DNA sondy se vzorkem nebyla úspěšná).

Typická kodelece oblastí 1p36 a 19q13 pro oligodendrogliomy byla detekována pouze u dvou ze čtyř pacientů (č.5 a 23). Ve vzorku z opakovaného odběru pacienta č.5, u jež se oligodendrogliom třetího stupně vyvinul do glioblastom čtvrtého stupně, byla nalezena také trizomie chromozomu 7 v nízkofrekvenčním klonu (5%).

Sondou *LSI PTEN (10q23) / CEP 10* nebyly v této skupině nemocných detekovány významné změny.

## **Primární glioblastomy**

Celkem bylo metodou I-FISH vyšetřeno sedm nemocných s primárním glioblastomem. Patologický nález alespoň jedné z použitých DNA sond byl prokázán u všech pacientů, a to nejčastěji pomocí sond *XL EGFR amp* a *LSI PTEN (10q23) / CEP 10*. Jednalo se o klony se samostatnou trizomií chromozomu 7 nebo klony se současnou amplifikací *EGFR* genu a klony s monozomií chromozomu 10. Mezi další detekované aneuploidie patřily: a) trizomie chromozomu 19, které byly detekovány u tří pacientů (č.11, 16 a 17) a b) monozomie chromozomu 1, která byla detekována pouze jedenkrát v nízkofrekvenčním klonu (3%) ve vzorku z druhého odběru pacienta č.11.

Pacient č.11 vykazoval patologický nález pro všechny použité DNA sondy. Nádorové buňky nesly následující aberace – delece oblasti 1q25, trizomie chromozomů 7 a 19 a monozomie chromozomu 10. Při recidivě nádoru se objevila navíc monozomie chromozomu 1 a také bialelická ztráta genu *PTEN*.

U pacienta č.12 metoda I-FISH neprokázala změny na chromozomech 1 a 19 v prvním ani druhém odběru. V diagnostickém vzorku byly prokázány klony s monozomií chromozomu 10 a změnami na chromozomu 7 – konkrétně klony s trizomií 7 se současnou amplifikací *EGFR* genu a klony se samostatnou amplifikací *EGFR* bez trizomie. Ve vzorku z druhého odběru byly detekovány samostatné klony s trizomií 7 anebo amplifikací *EGFR* genu, zatímco klony se současnou trizomií 7 a amplifikací *EGFR* genu byly eliminovány.

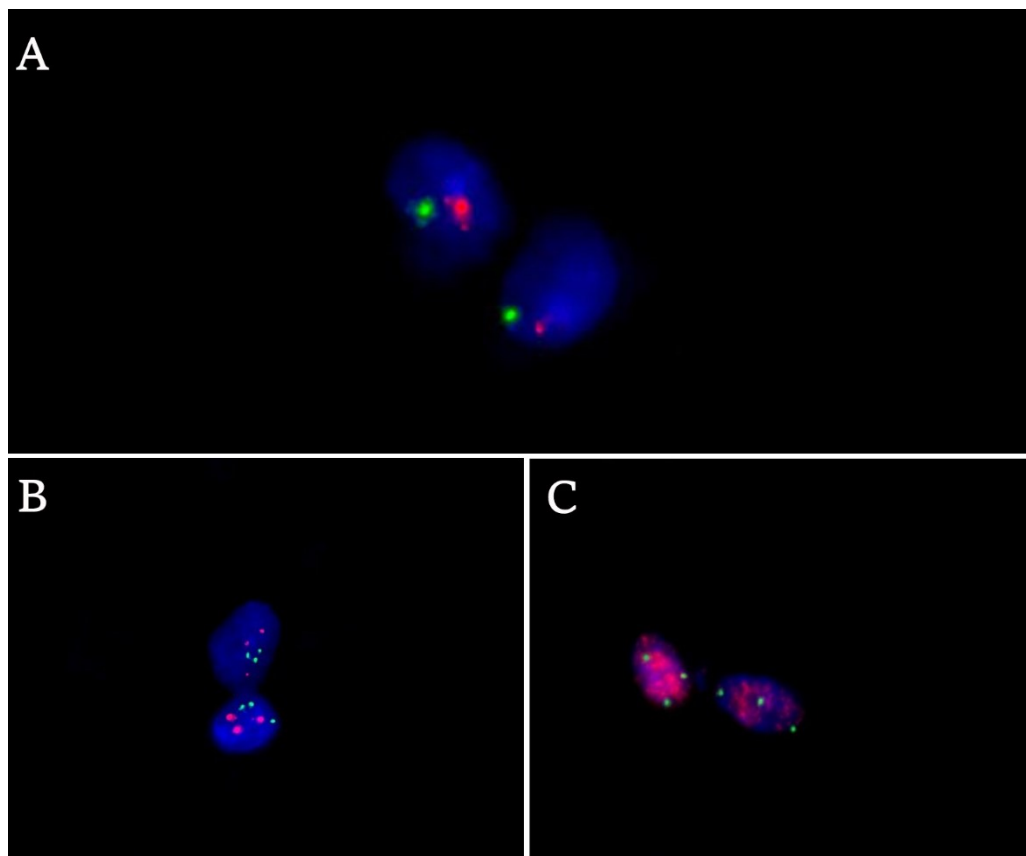
Pacient č.15 také vykazoval změny pouze na chromozomech 7 a 10. V diagnostickém vzorku to byla amplifikace *EGFR* a dva různé klony – jeden pouze s monozomií chromozomu 10 a druhý s monozomií 10 současně s bialelickou ztrátou genu *PTEN*. Ve vzorku z druhého odběru přibyly klony se současnou trizomií 7 a amplifikací genu *EGFR*, zatímco klony s monozomií 10 se současnou bialelickou delecí genu *PTEN* nebyly detekovány.

U pacienta č.16 se po normálním nálezu v prvním odběru objevila parciální zisk oblasti 1q25 ve vzorku z druhého odběru. Dále byly v obou odběrech detekovány klony s trizomií chromozomu 19, klony se současnou trizomií 7 a amplifikací *EGFR* a klony se samostatnou amplifikací *EGFR* bez trizomie. Ve vzorku z druhého odběru nebyl detekován klon s monozomií 10 a současně s bialelickou ztrátou genu *PTEN*. Byla zde detekována pouze monozomie chromozomu 10.

Pacient č.17 se nálezy v prvním odběru lišil od vzorku z druhého odběru ztrátou klonu s trizomií chromozomu 19 a klonu se současnou trizomií 7 a amplifikací *EGFR* genu. Klony se samostatnou amplifikací *EGFR* genu a monozomií chromozomu 10 ve vzorku z druhého odběru zůstaly.

U pacienta č.21 byl detekován normální nález až na nízkofrekvenční klon s trizomií 7 v diagnostickém vzorku. Vzorek z opakovaného odběru vykazoval normální profil pro všechny použité DNA sondy.

Pacient č.22 vykazoval tetrazomie pro chromozomy 1 a 19 v diagnostickém vzorku společně s následujícími klony: s trizomií 7, s amplifikací *EGFR* a s monozomií 10. Jeho druhý odběr se lišil normálním nálezem na chromozomech 1 a 19 a nabytím nového klonu s delecí genu *PTEN*.



**Obrázek 13:** Ukázka patologických nálezů použitých DNA sond gliomového panelu. **A:** dvě nádorové buňky s monozomií chromozomu 1 (jeden červený a jeden zelený signál), detekováno sondou LSI *PTEN* / CEP 10 ; **B:** dvě nádorové buňky s trizomií chromozomu 19 (tři červené a tři zelené signály), detekováno sondou XL 19p/19q del; **C:** dvě nádorové buňky s trizomií chromozomu 7 (tři zelené signály) společně s amplifikací *EGFR* genu (roztroušený červený signál), detekováno sondou XL *EGFR* amp.

## Souhrnné výsledky a analýza klonálního vývoje

Všichni nemocní byli dále vyšetřeni metodou aCGH/SNP pro detekci nebalancovaných změn a oblastí se ztrátou heterozygotnosti neboli s uniparentální dizomií (UPD). Pro většinu pacientů byly již výsledky dostupné z databází laboratoře CNC VFN a 1. LF UK a pro sedm vzorků byla aCGH/SNP provedena z archivovaného materiálu. aCGH/SNP přispěla k odhalení mikroskopických změn v genomu gliomů a k určení zlomových míst a rozsahů strukturních aberací. Pomocí aCGH/SNP analýzy jsme byli schopni porovnat genomové profily

diagnostických vzorků a vzorků z opakovaných odběrů. Hledali jsme chromozomové aberace, které by mohly být dávány do souvislosti s progresí onemocnění.

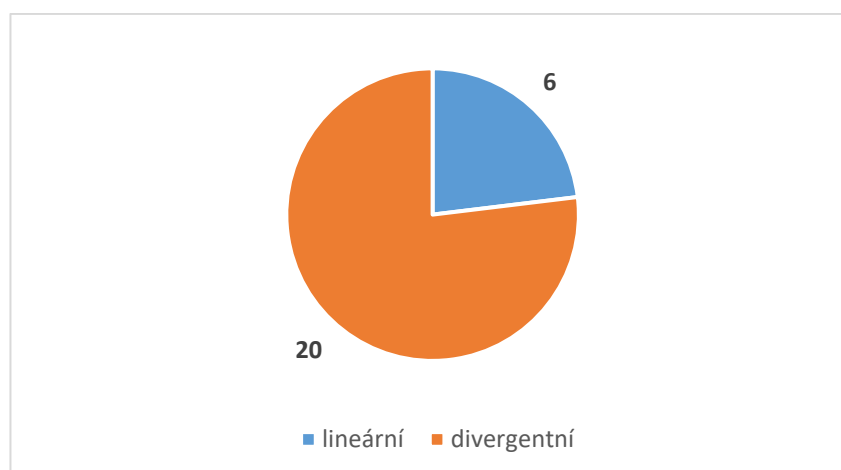
K výsledkům aCGH/SNP metody byly přidány parametry zjištěné metodou (MS-)MLPA. Tyto výsledky byly již v databázích laboratoře dostupné pro každý odběr. Jedná se primárně o mutační stav *IDH1* genu, stav *CDKN2A/B* lokusu a metylační stav promotoru *MGMT* genu, jelikož jsou to významní prognostiční ukazatelé. Výsledky metod aCGH/SNP a (MS-)MLPA byly porovnávány jako celek společně s výsledky I-FISH pro provedení komplexní analýzy genomových profilů gliomů a jejich rozdílů mezi diagnostickými vzorky a vzorky z opakovaných odběrů při progresi onemocnění. Souhrnný přehled patologických nálezů ve vyšetřovaném souboru shrnují **Tabulky P1-P3 v Příloze**.

Na základě detekovaných aberací byl pacientům přiřazen typ klonálního vývoje, viz **Tab. 6**. Za lineární vývoj jsme považovali evoluci nádoru, ve které byla zjištěna pouze akumulace nových aberací, ale žádné nevymizely. Za druhý typ klonálního vývoje, tedy za divergentní evoluci, jsme považovali takové nádory, ve kterých bylo detekováno vícero různých klonů nádorových buněk v diagnostickém a opakovaném vzorku. To znamená, že při opakovaných odběrech vymizely některé aberace, které byly přítomny při prvním odběru. Ve vyšetřovaném souboru pacientů bylo zhodnoceno 20 pacientů s divergentním klonálním vývojem a 6 pacientů s lineárním vývojem (viz **Obr. 14**). Byli vybráni tři pacienti k detailnímu popisu klonálního vývoje a progresi jejich onemocnění.

ID	Typ klonálního vývoje
<b>Astrocytomy</b>	
1	divergentní
2	divergentní
3	divergentní
4	divergentní
6	divergentní
7	divergentní
8	divergentní
9	divergentní
10	divergentní
14	lineární
19	divergentní

20	divergentní
24	divergentní
25	divergentní
26	lineární
<b>Oligodendrogliomy</b>	
5	lineární
13	lineární
18	lineární
23	lineární
<b>Primární glioblastomy</b>	
11	divergentní
12	divergentní
15	divergentní
16	divergentní
17	divergentní
21	divergentní
22	divergentní

**Tabulka 6:** Typy klonálního vývoje nádoru nemocných ve vyšetřovaném souboru.



**Obrázek 14:** Početní zastoupení nemocných ve vyšetřovaném souboru dle typu klonálního vývoje.

## Astrocytomy

V této skupině nemocných bylo porovnáváno 15 nemocných s astrocytomech. Souhrnná **Tab. 7** ukazuje patologické nálezy na jednotlivých ramenech chromozomů 1 až 22 a celých chromozomech X a Y, dále mutační stav *IDH1* genu a metylační stav *pMGMT*. **Obr. 16** a **17** ukazují frekvenci patologických nálezů na jednotlivých ramenech chromozomů 1

až 22 a celých chromozomech X a Y. Dále **Obr. 18 a 19** schematicky znázorňují frekvence a rozsahy všech detekovaných patologických změn v souboru nemocných s astrocytomem na ideogramech všech 23 chromozomů.

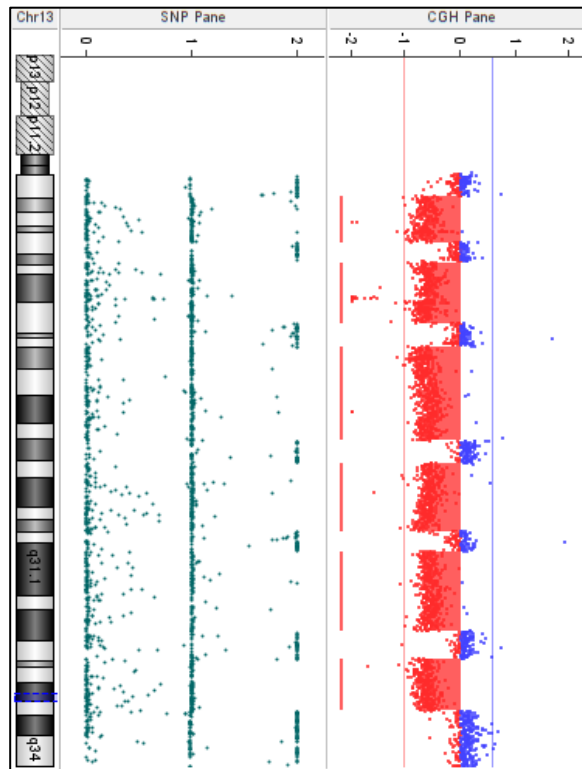
Pozitivní nález mutace R132H genu *IDH1* byl prokázán u deseti pacientů (č.1-4, 8-10, 24-26) ve všech jejich odběrech. U pacientů č.6, 7, 14, 19 a 20 mutace *IDH1* prokázána nebyla. U tří z nich (č.6, 14 a 19) onemocnění nakonec postoupilo do glioblastomu čtvrtého stupně.

Hypermethylace promotoru *MGMT* genu byla nalezena ve 13 diagnostických vzorcích. V diagnostických odběrech 2A a 14A nebyla prokázána, ale při opakovaných odběrech těchto pacientů byla již detekována. Jedenkrát ve vzorku z opakovaného odběru hypermethylace *pMGMT* vymizela, a to u pacienta č.20 s diagnózou difúzního astrocytomy druhého stupně. Tento pacient vykazoval normální profil aCGH/SNP při jeho prvním i druhém odběru.

Hypermethylace promotoru genu *MLH3* (*pMLH3*) byla detekována čtyřikrát v diagnostických vzorcích (1A, 8A, 10A a 25A). Znovu se hypermethylace potvrdila jen u pacientky č.1 při opakovaném odběru, při opakovaných odběrech pacientů č.8, 10 a 25 hypermethylace *pMHL3* vymizela. Jako nová změna se hypermethylace objevila při opakovaných odběrech u dvou pacientů (2B a 4B).

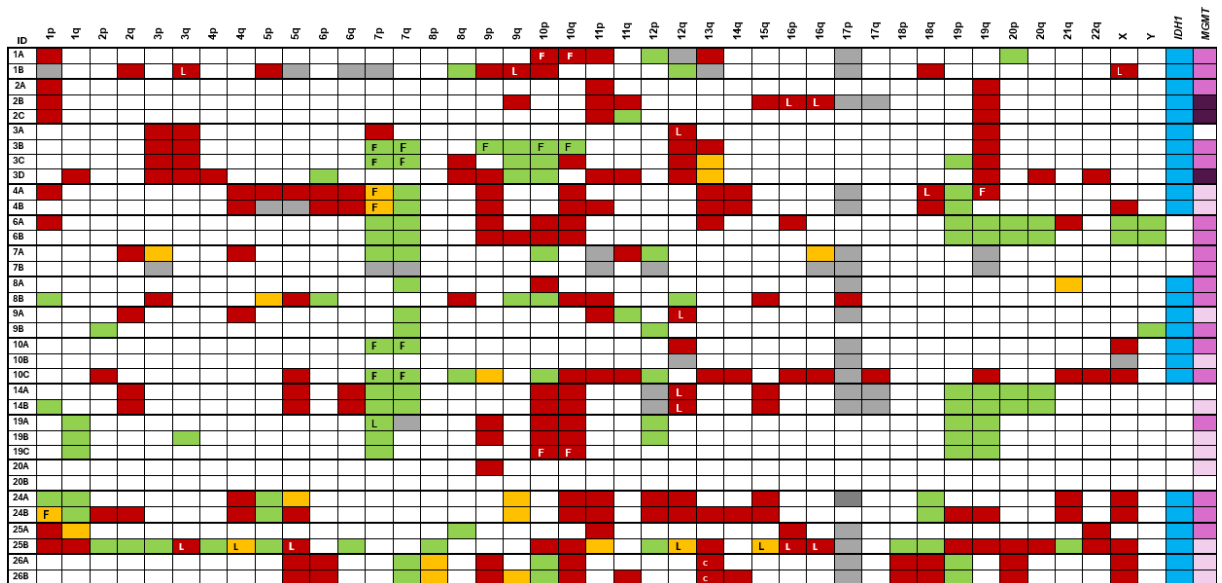
**Obr. 18 a 19** naznačují, že detekované změny na chromozomech 7, 10, 12, 17, 18, 19, 20 a 21 se výrazně nelišily mezi diagnostickými vzorky a vzorky z opakovaných odběrů. Na chromozomu 17 to byla nejčastěji ztráta heterozygotnosti, chromozom 7 vykazoval nejčastěji zisky a chromozom 10 zase ztráty. Na chromozomu 19 byly při obou odběrech detekovány zisky (často celého chromozomu) a ztráty (kratší delece na dlouhém ramenu). Ztráty celého chromozomu 19 se objevily až ve vzorcích z opakovaných odběrů. Na chromozomech 12, 18, 20 a 21 docházelo ke komplexním přestavbám různého rozsahu.

Chromothripse byla detekována jen jedenkrát, a to v obou odběrech pacientky č.26. Ukazuje jí **Obr. 14**.

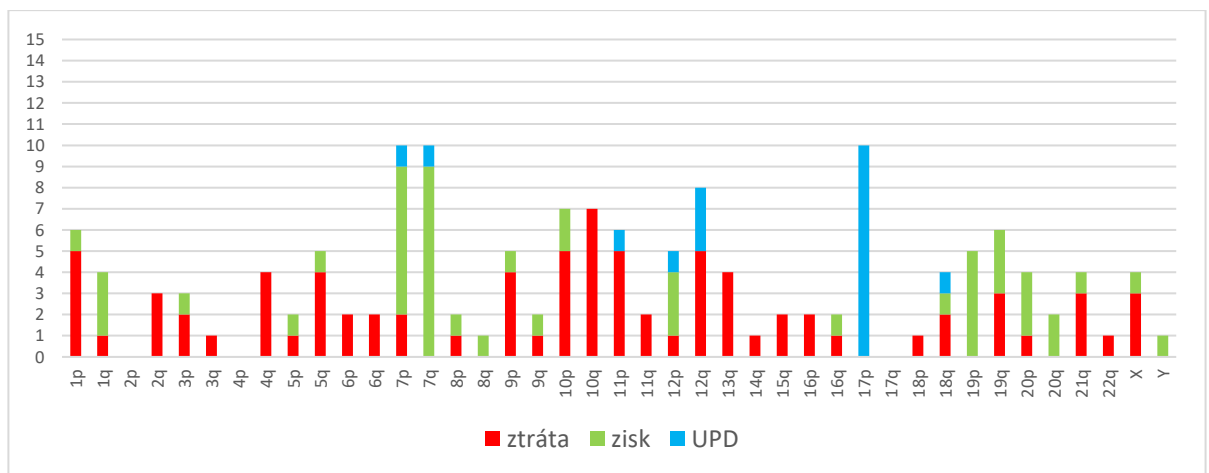


**Obrázek 15:** Ukázka chromothripse chromozomu 13 u pacientky č.26 detekována aCGH/SNP array.

Při porovnání s diagnostickými vzorky, **Obr. 17 a 18** vykazují patrný trend ve výrazném nabytí nových komplexních aberací s progresí onemocnění na chromozomech 5, 9, 11, 13, 15, 16 a 22. Na chromozomu 5 byly při progresi onemocnění detekovány častěji zisky na krátkém ramenu a ztráty na dlouhém ramenu. Na chromozomu 9 se objevily komplexní přestavby na celém dlouhém ramenu při progresi onemocnění, zatímco ztráty na krátkém ramenu se jeví v podobné frekvenci jako v diagnostických vzorcích. Na dlouhém ramenu chromozomu 11 byly detekovány komplexní změny s progresí onemocnění, nejčastěji ztráty různého rozsahu. A na chromozomech 13, 15, 16 a 22 byly s progresí onemocnění detekovány ztráty různého rozsahu. Přesné rozsahy aberací shrnuje **Tabulka P1** (Příloha).

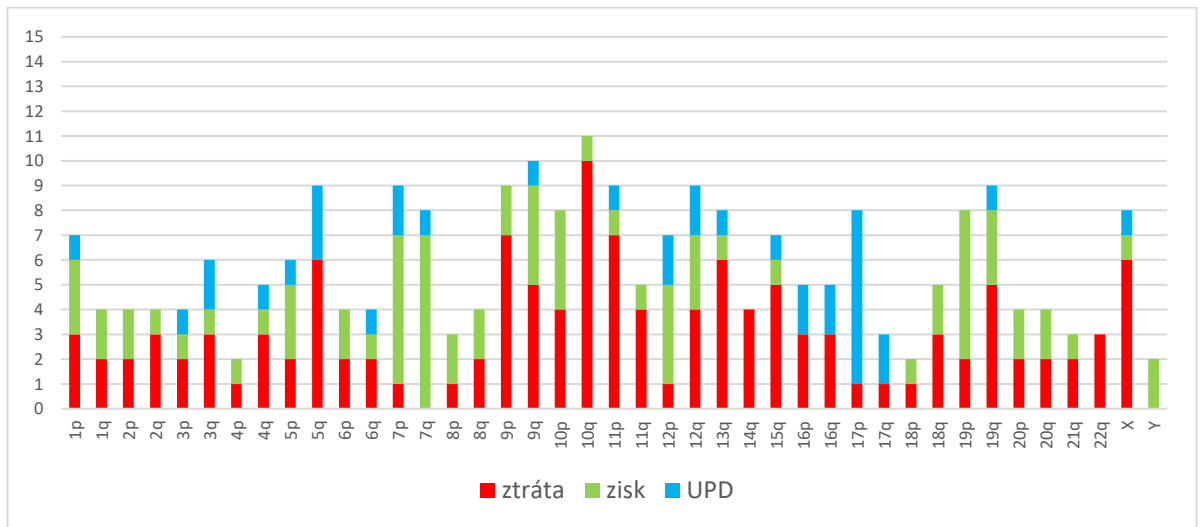


**Tabulka 7: Souhrnná tabulka nálezů skupiny astrocytomů.** ■ ztráty, ■ zisky, ■ zisky a ztráty současně, F: změna zjištěna pouze metodou I-FISH, ■ přítomnost mutace R132H v *IDH1* genu, procentuální vyjádření hypermetylace promotoru genu *MGMT* → ■ 10-25%; ■ 26-60%; ■ 61-100%, ■ nebo L: přítomnost oblasti se ztrátou heterozygotnosti.

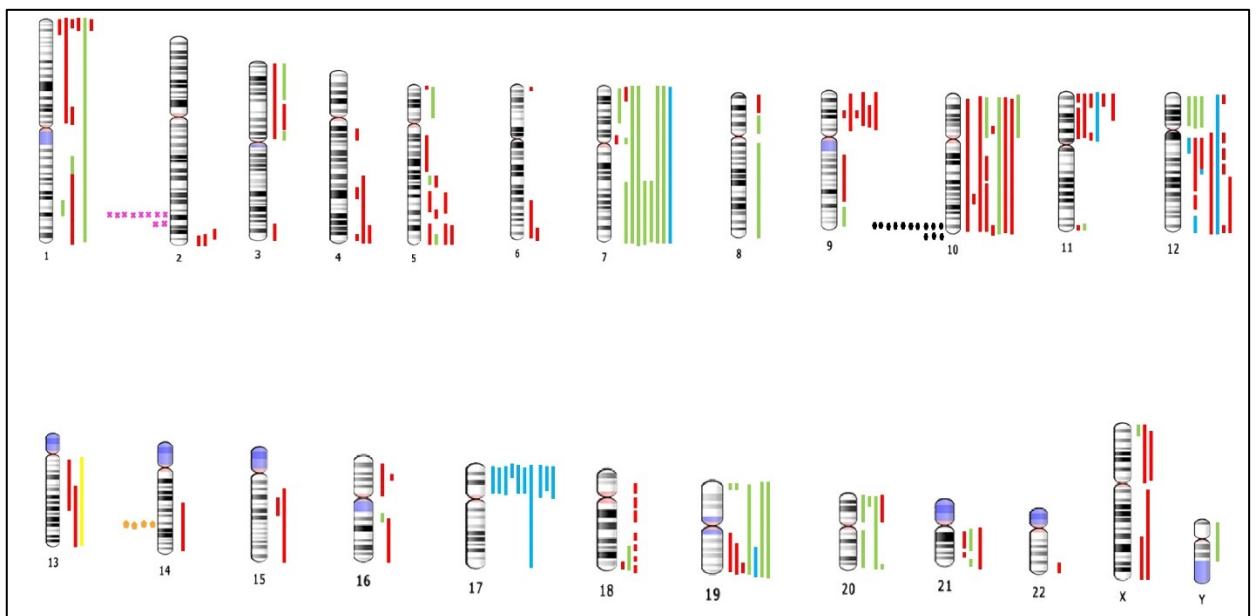


**Obrázek 16: Početní zastoupení ztrát, zisků a UPD na ramenech všech chromozomů v diagnostických vzorcích skupiny nemocných s astrocytomy.** Osa X značí ramena chromozomu. Osa Y značí počet zisků, ztrát a oblastí se ztrátou heterozygotnosti (UPD), kterými byla ramena chromozomů zasažena.

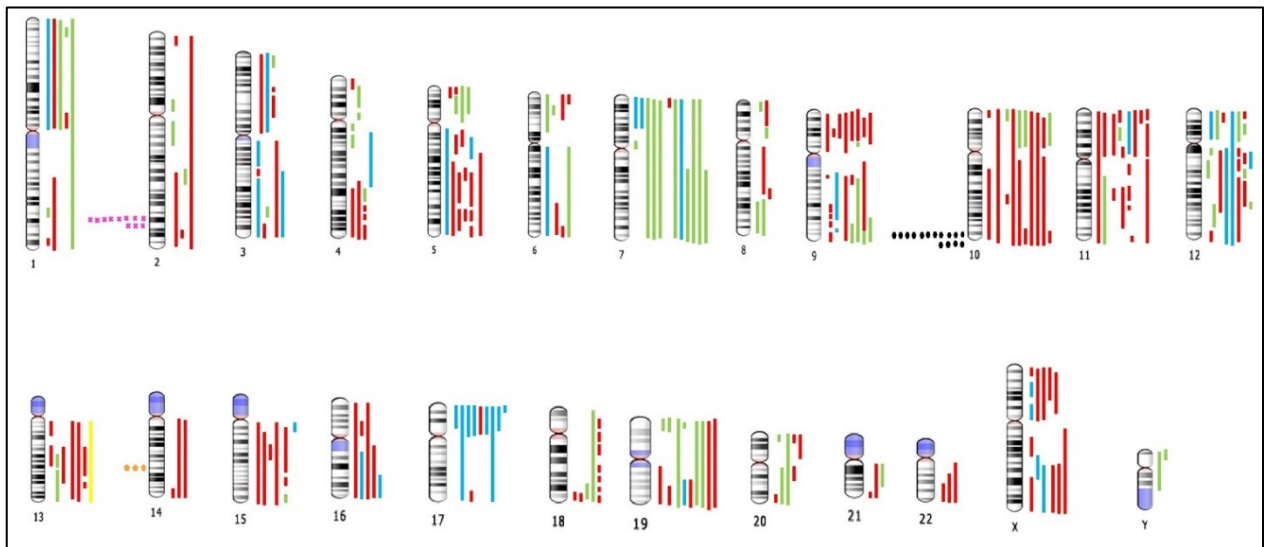




**Obrázek 17: Početní zastoupení ztrát, zisků a UPD na ramenech všech chromozomů v opakovaných odběrech skupiny nemocných s astrocytomy.** Osa X značí ramena chromozomu. Osa Y značí počet zisků, ztrát a oblastí se ztrátou heterozyzity (UPD), kterými byla ramena chromozomů zasažena.



**Obrázek 18: Schematické znázornění frekvence a rozsahu všech detekovaných změn v diagnostických vzorcích nemocných s astrocytmem.** ■ delecce, ■ zisky, ■ získané UPD, ■ chromothripsis, \* mutace *IDH1* genu, ◆ hypermetylace *pMGMT*, ◆ hypermetylace *pMLH3*.



**Obrázek 19:** Schematické znázornění frekvence a rozsahu všech detekovaných změn ve vzorcích z opakovaných odběrů nemocných s astrocytome. ■ delecce, ■ zisky, ■ získané UPD, ■ chromothripsis, \* mutace *IDH1* genu, ● hypermetylace *pMGMT*, ◆ hypermetylace *pMLH3*.

## Oligodendrogliomy

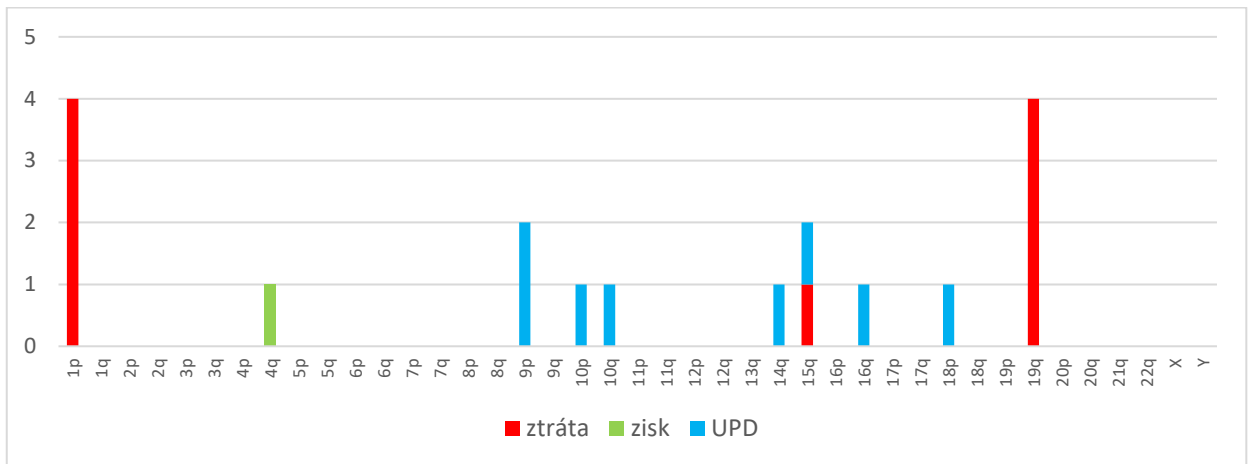
Ve této skupině byly porovnávány rozdíly genomových profilů diagnostických vzorků a vzorků z druhých odběrů čtyř nemocných s oligodendrogliomem. Souhrnná **Tab. 8** ukazuje patologické nálezy na jednotlivých ramenech chromozomů 1 až 22 a celých chromozomech X a Y, dále mutační stav *IDH1* genu a metylační stav *pMGMT*. **Obr. 20** a **21** ukazují frekvenci patologických nálezů na jednotlivých chromozomech. Dále **Obr. 22** a **23** schematicky znázorňují frekvence a rozsahy všech detekovaných patologických změn v souboru nemocných s oligodendrogliomem na ideogramech všech 23 chromozomů. Přesné rozsahy patologických nálezů shrnuje **Tabulka P2** (Příloha).

Všichni nemocní s oligodendrogliomem vykazovali lineární evoluci onemocnění, jak ukazuje **Tab. 6**, tj. žádné patologické klonové detekované v diagnostických vzorcích nevymizely při druhých odběrech.

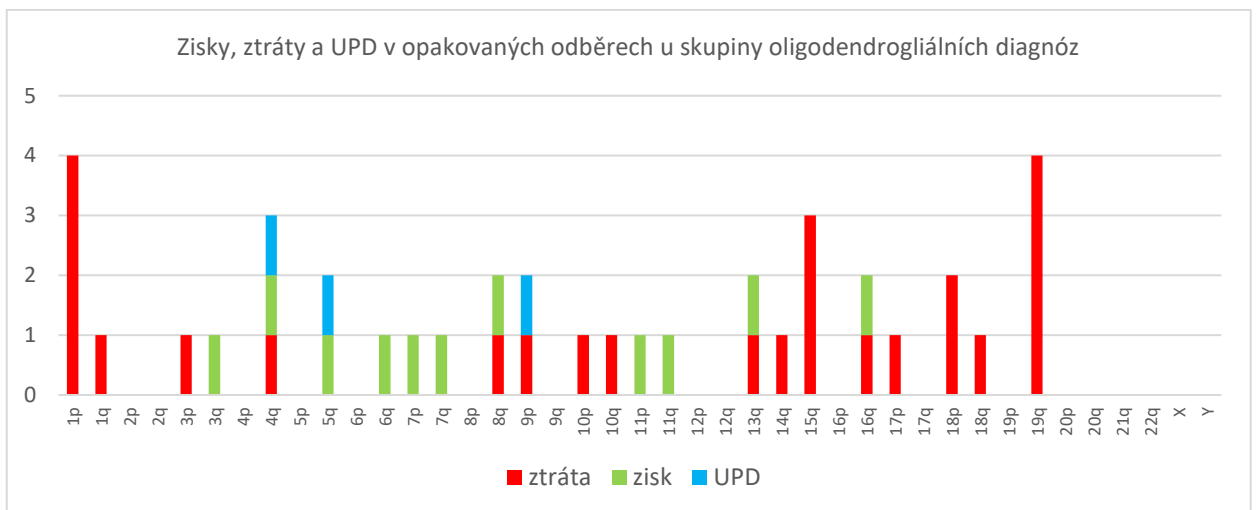
Mutace genu *IDH1* byla nalezena při všech odběrech tří pacientů – č.13, 18 a 23. Pacientka č.5 nevykazovala pozitivitu na mutaci R132H genu *IDH1* v žádném ze svých odběrů. U této pacientky došlo k progresi onemocnění až do glioblastomu čtvrtého stupně.

Hypermetylace *pMGMT* byla prokázána u všech nemocných s výjimkou diagnostického vzorku pacientky č.5.

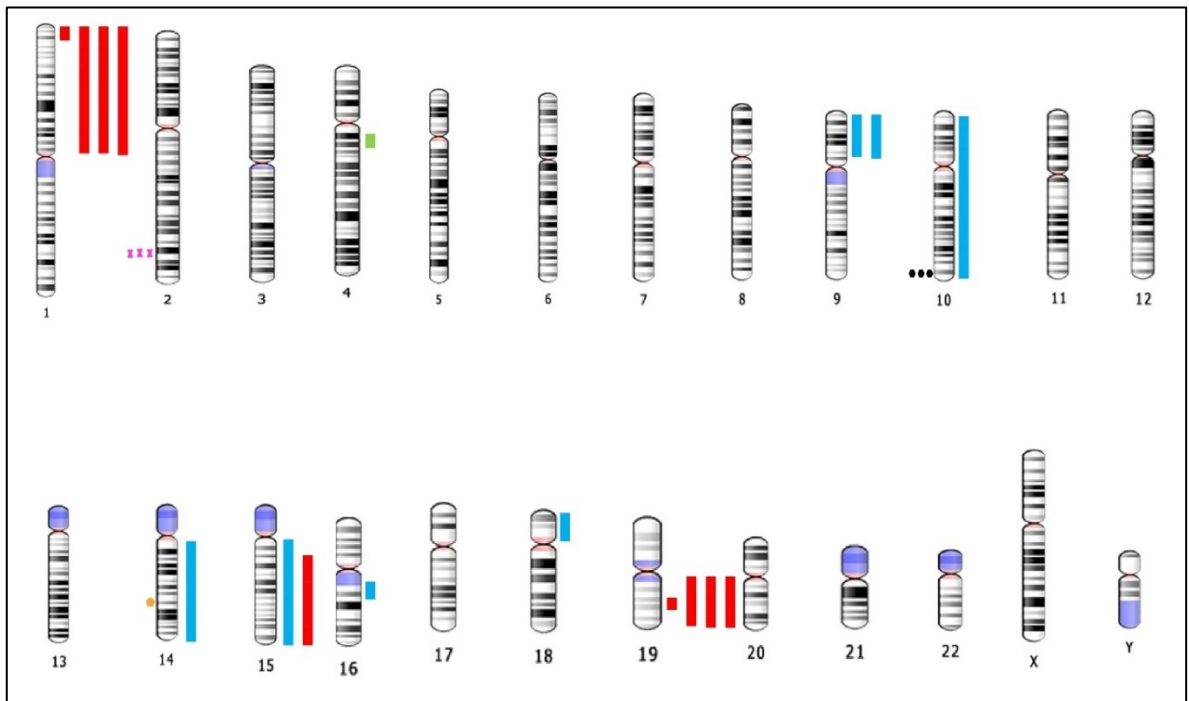




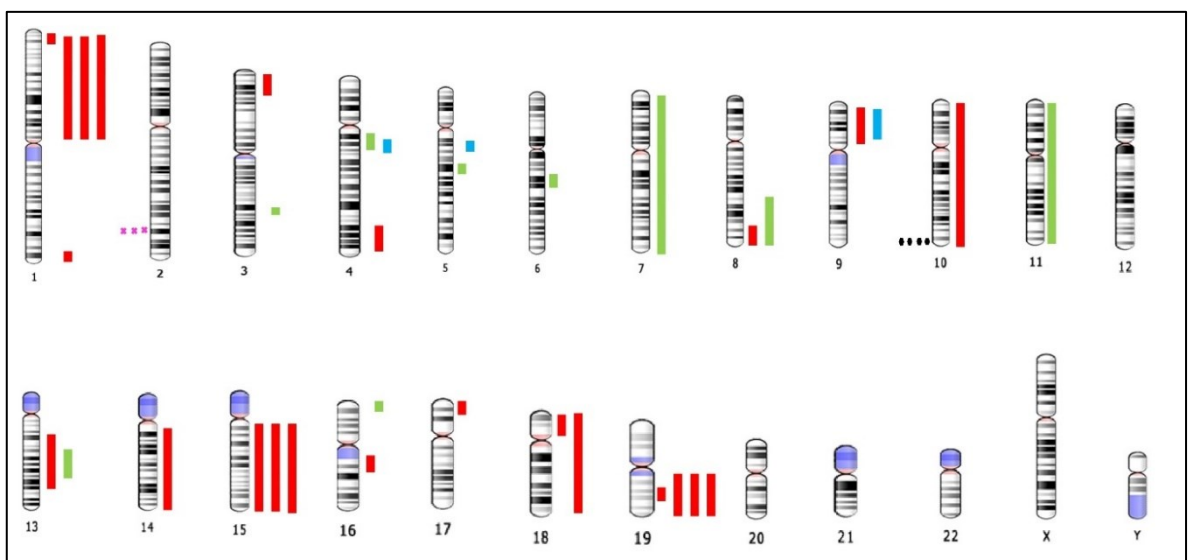
**Obrázek 20: Početní zastoupení ztrát, zisků a UPD na ramenech všech chromozomů v diagnostických vzorcích skupiny nemocných s oligodendrogliomy.** Osa X značí ramena chromozomu. Osa Y značí počet zisků, ztrát a oblastí se ztrátou heterozygosity (UPD), kterými byla ramena chromozomů zasažena.



**Obrázek 21: Početní zastoupení ztrát, zisků a UPD na ramenech všech chromozomů v opakovaných odběrech skupiny nemocných s oligodendrogliomy.** Osa X značí ramena chromozomu. Osa Y značí počet zisků, ztrát a oblastí se ztrátou heterozygosity (UPD), kterými byla ramena chromozomů zasažena.

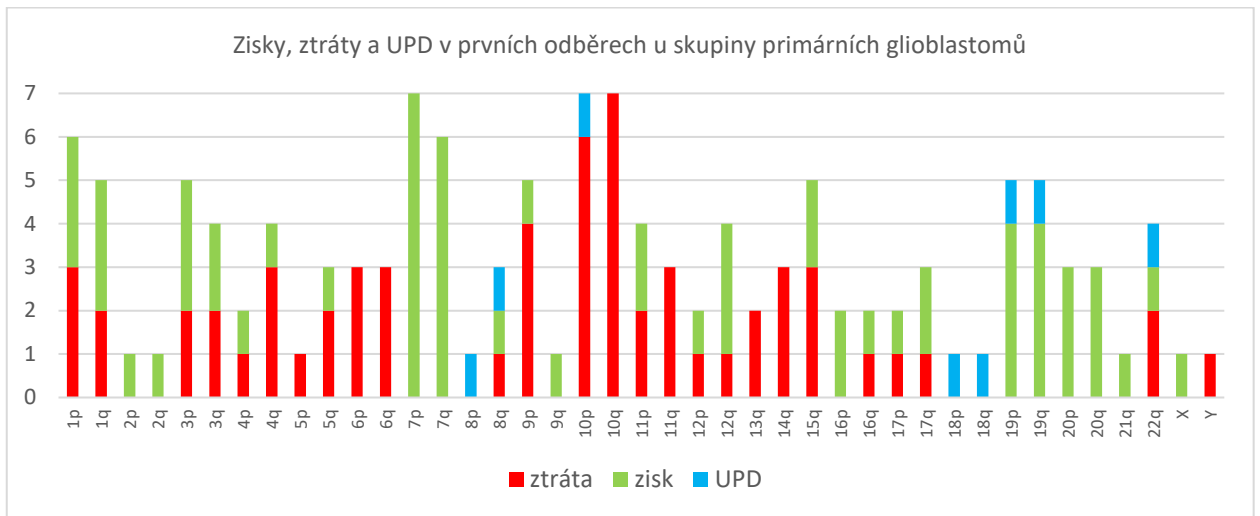


**Obrázek 22: Přehled nálezů na jednotlivých chromozomech v diagnostických vzorcích nemocných s oligodendrogliomem.** ■ delecce, ■ zisky, ■ získané UPD, ✕ mutace *IDH1* genu, ◆ hypermetylace *pMGMT*, ◆ hypermetylace *pMLH3*.

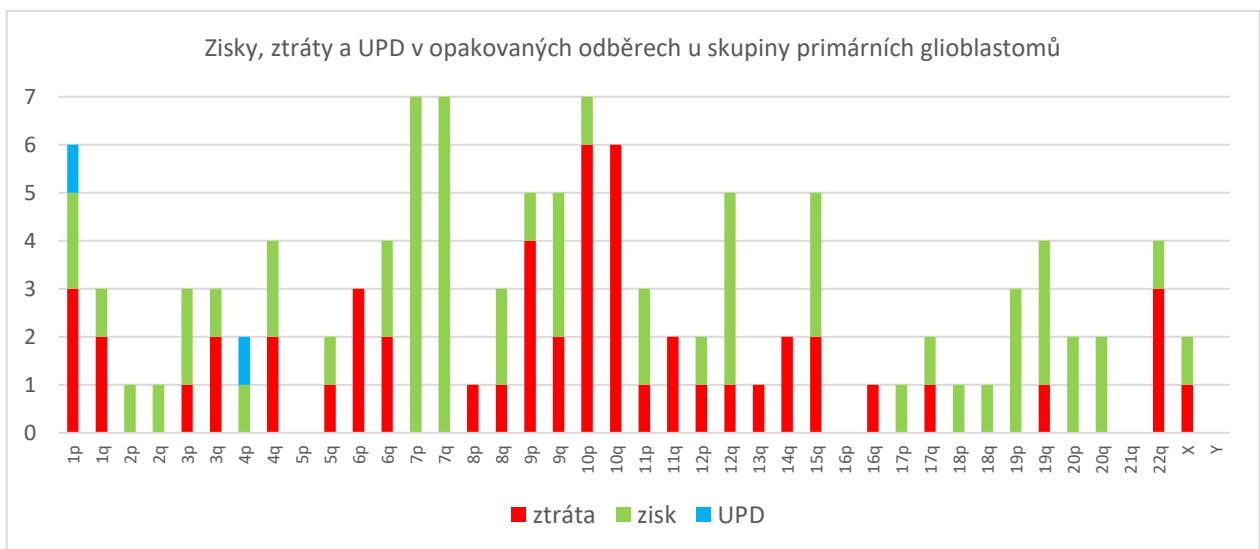


**Obrázek 23: Přehled nálezů na jednotlivých chromozomech ve vzorcích z opakovaných odběrů z oligodendrogliomů.** ■ delecce, ■ zisky, ■ získané UPD, ✕ mutace *IDH1* genu, ◆ hypermetylace *pMGMT*, ◆ hypermetylace *pMLH3*.

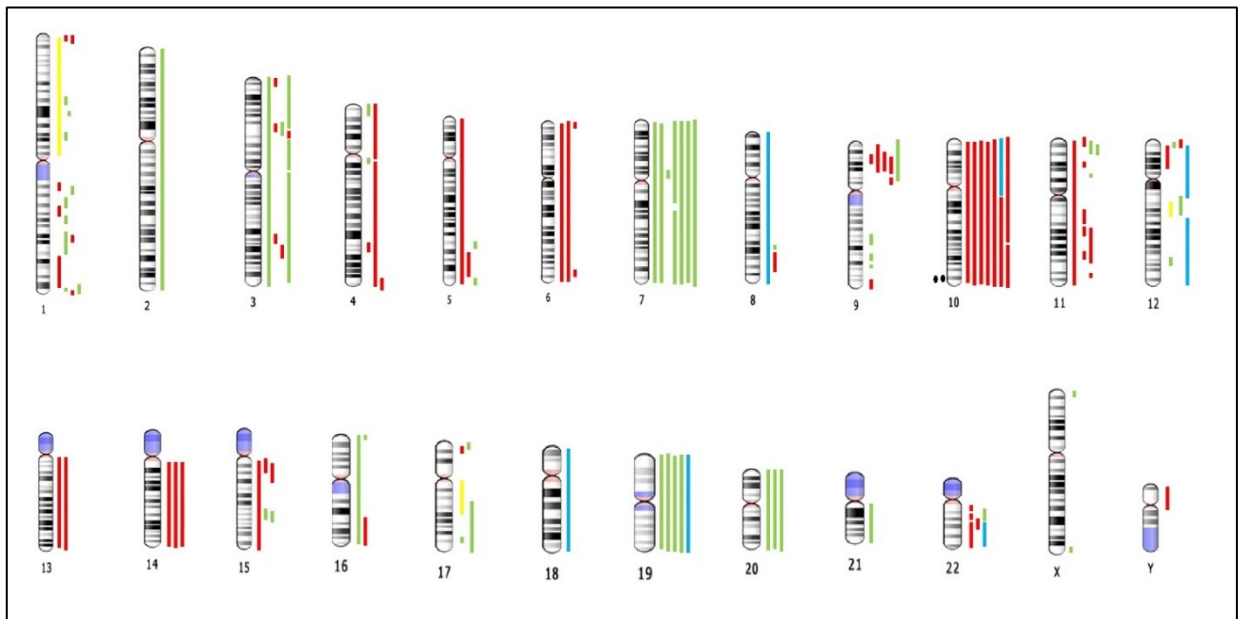




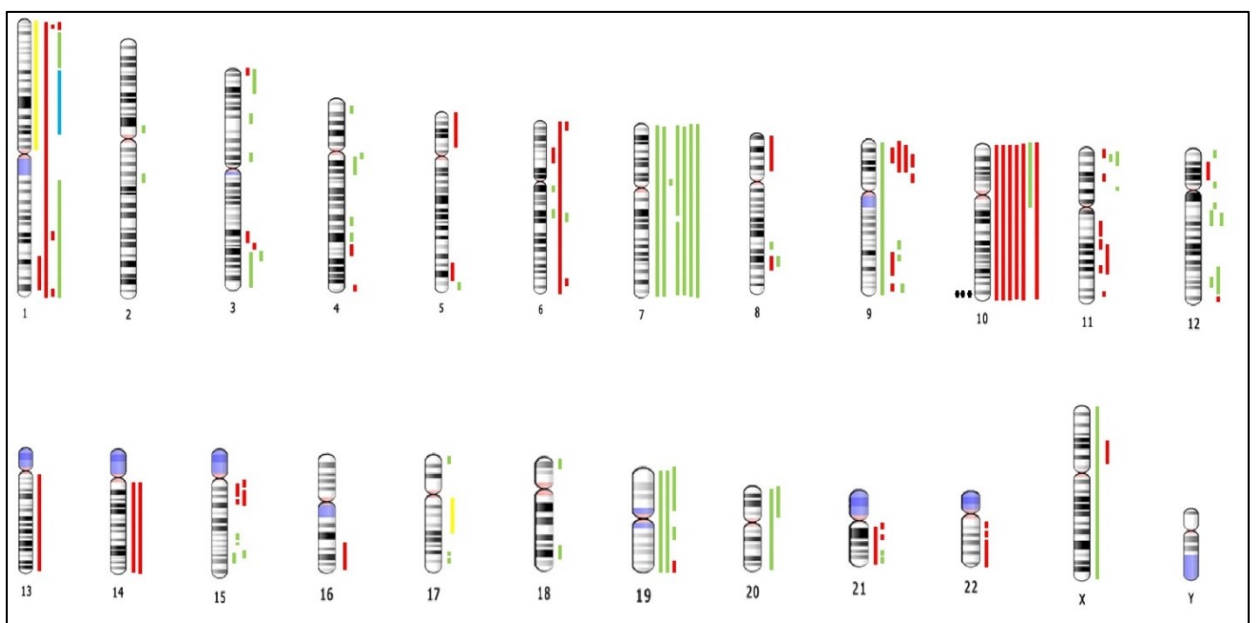
**Obrázek 24: Početní zastoupení ztrát, zisků a UPD na ramenech všech chromozomů v diagnostických vzorcích skupiny nemocných s primárními glioblastomy.** Osa X značí ramena chromozomu. Osa Y značí počet zisků, ztrát a oblastí se ztrátou heterozygoty (UPD), kterými byla ramena chromozomů zasažena.



**Obrázek 25: Početní zastoupení ztrát, zisků a UPD na ramenech všech chromozomů v opakovaných odběrech skupiny nemocných s primárními glioblastomy.** Osa X značí ramena chromozomu. Osa Y značí počet zisků, ztrát a oblastí se ztrátou heterozygoty (UPD), kterými byla ramena chromozomů zasažena.



**Obrázek 26: Přehled nálezů na jednotlivých chromozomech v diagnostických vzorcích nemocných s primárním glioblastomem.** ■ delecce, ■ zisky, ■ získané UPD, ■ chromothripsis, ✖ mutace *IDH1* genu, ● hypermetylace *pMGMT*, ◆ hypermetylace *pMLH3*.



**Obrázek 27: Přehled nálezů na jednotlivých chromozomech ve vzorcích z opakovaných odběrů nemocných s primárním glioblastomem.** ■ delecce, ■ zisky, ■ získané UPD, ■ chromothripsis, ✖ mutace *IDH1* genu, ● hypermetylace *pMGMT*, ◆ hypermetylace *pMLH3*.



## 10. Diskuze

Difúzní gliomy patří mezi nejčastější nádory centrální nervové soustavy dospělých. Důležitou vlastností je heterogenita, tj. přítomnost molekulárně a fenotypicky rozdílných populací buněk v rámci jednoho nádoru. Je to právě heterogenita a difúzní charakter těchto tumorů, který nádorovým buňkám dává možnost genetického a metabolického přeprogramování. Tímto se vytváří populace nádorových buněk rezistentních k léčbě. To vše přispívá k velmi špatnému celkovému přežití nemocných.

Molekulární profily difúzních gliomů byly postupně zařazovány do WHO klasifikací, nicméně pacientům se stále dostává léčby se stejným protokolem, tj. maximální možná resekce, radiace a alkylační chemoterapie (Moffet et al. 2023). Studium genomových profilů difúzních gliomů při jejich progresi a recidivě je důležité pro lepší pochopení patogeneze a maligního vývoje těchto nádorů. Určení aberací spojených s progresí nádoru by mohlo přispět k vývoji cílené léčby.

V této studii bylo vyšetřeno 26 nemocných s difúzním gliomem, kterým byly mezi lety 2004 – 2023 chirurgicky odebrány minimálně dva vzorky nádorové tkáně. Tito pacienti byli dále rozděleni do skupin dle tří základních subtypů v době jejich prvního odběru – nemocní s astrocytomem, oligodendrogliomem anebo primárním glioblastomem. U všech nemocných bylo provedeno vyšetření I-FISH s použitím gliomového panelu skládajícího se ze čtyř DNA sond pro charakterizování základních aberací gliomů – kodelece 1p/19q, amplifikace *EGFR* genu, delece *PTEN* genu a aneuploidie chromozomů 7 a 10. Dále bylo u všech nemocných provedeno vyšetření s použitím metod (MS-)MLPA a aCGH/SNP array. Těmito molekulárními metodami jsme detekovali kryptické změny v genomu nádorových buněk, epigenetické změny a také oblasti se ztrátou heterozygotnosti. Zaměřili jsme se na oblasti a aberace na jednotlivých chromozomech, které by mohly být dávány do souvislosti s progresí onemocnění, tj. byly detekovány rekurentně při opakovaných odběrech, pro sledování vývoje genetického a epigenetického profilu tumoru.

**Astrocytomy:** Skupina nemocných s astrocytomem obsahovala 15 pacientů s dvěma a více odběry v průběhu onemocnění. Metodou I-FISH byla potvrzena přítomnost polyploidie v relativně nízkém počtu diagnostických vzorků (čtyřikrát) a v ještě nižším počtu (jedenkrát) vzorků z opakovaných odběrů. Ve třech případech diagnostických vzorků s polyploidními

klony se jednalo o diagnózy astrocytomů druhého stupně – pacienti č. 1, 7 a 10. U pacientky č.4 s polyploidními klony v diagnostickém odběru se jednalo o astrocytom již třetího stupně. Buňky s vyšším genomovým obsahem hrají klíčovou roli v evoluci nádorů a získávání rezistence na léčbu. Polyploidie dokáže umožnit nádorovým buňkám rychlou adaptaci na selekční tlaky, což vede k evoluci buněk, které jsou vůči léčbě rezistentní (Coward a Harding 2014). U těchto pacientů mohla populace polyploidních nádorových buněk přispět k progresi onemocnění. U všech čtyř pacientů se ale při opakovaných odběrech polyploidní klony nepotvrdily. Pro toto mohou existovat různá vysvětlení, např. a) polyploidie v nádorových buňkách může být reverzibilní a z polyploidních klonů se stanou znovu buňky diploidní (Erenpreisa et al. 2014), b) ve vyšetřovaném vzorku v době opakovaného odběru nebyly polyploidní buňky přítomny.

Některé aberace zachycené molekulárními metodami ve skupině astrocytomů se nepodařilo zachytit metodou I-FISH. Nádorové klony s danými aberacemi nemusely být přítomny ve vyšetřovaném vzorku pro vyšetření I-FISH z důvodu heterogenity nádorové tkáně. Zatímco při použití molekulárních metod, kdy je vyšetřována celková DNA mnoha buněk najednou, je šance na zachycení těchto klonů vyšší. Naopak některé nádorové klony byly ve skupině astrocytomů zachyceny pouze metodou I-FISH. Jednalo se o klony nízkofrekvenční (nižší než 16%), které aCGH/SNP array nedokázala rozpoznat z důvodu svého rozlišení.

U pacientky č.2 byla detekována kodelece celých ramen 1p/19q ve třech odběrech v rámci progresu jejího onemocnění. Tato kodelece je typickým ukazatelem pro oligodendrogliom (Louis et al. 2021). Histopatologické vyšetření určilo diagnostický vzorek této pacientky jako astrocytom druhého stupně s výskytem znaků oligodendrogliomu. V době určování diagnózy (rok 2007) byla používána dřívější verze WHO klasifikace nádorů CNS a existovala entita ‚smíšeného oligoastrocytomu‘ (Kleihues et al. 2002). V tomto případě histopatologové ve oficiální zprávě oligodendrogliom nepřipouštěli. Zároveň byla u všech odběrů pacientky potvrzena mutace *IDH1*. Při druhém odběru pacientky byla histologická diagnóza určena jako sekundární glioblastom čtvrtého stupně. Detekovaný genomový profil v tomto odběru s diagnózou glioblastomu koreloval. Náš průkaz kodelece 1p/19q ukazuje spíše na oligodendrogliální onemocnění, které postoupilo do glioblastomu čtvrtého stupně. Při odběru třetím byl nádor znovu histologicky určen jako astrocytom druhého stupně. S touto poslední

diagnózou koreloval také nález nižšího počtu aberací než při druhém odběru. Toto mohlo být způsobeno nereprezentativním vzorkem nádorové tkáně při posledním opakovaném odběru.

Mutace genu *IDHI* je jedním z primárních ukazatelů astrocytomů (Louis et al. 2021). Tato charakteristická změna byla prokázána u deseti pacientů z 15 vyšetřovaných. U pacientů č.6, 7, 14, 19 a 20 mutace *IDHI* prokázána nebyla. Existence ‚pravých‘ *IDH*-wildtype (*IDH*-wt) difúzních astrocytomů nižších stupňů je dlouho středem debat. Výsledky skupiny Richardson et al. naznačují, že skupina nízkostupňových astrocytomů bez mutace *IDHI* genu je vzácná, nicméně existuje, a vyznačuje se lepším celkovým přežitím nemocných a molekulárně se podobá méně agresivním případům. Zatímco existuje také druhá skupina těchto *IDH*-wt astrocytomů, která se sice histologicky jeví jako difúzní astrocytom druhého až třetího stupně, ale molekulárně a klinicky se ovšem podobá glioblastomu čtvrtého stupně. To znamená, že vykazuje alespoň některé genetické znaky glioblastomu, tj. amplifikace *EGFR* genu, homozygotní delece *CDKN2A/B* genu, aberace *PTEN* genu, mutace promotoru genu *TERT* a současná ztráta chromozomu 10 se získáním chromozomu 7 (Richardson et al. 2021).

U nemocných s *IDH*-wt astrocytomem se v této studii vyskytují tři pacienti (č.6, 14 a 19), u kterých byl molekulární profil nádorů podobný glioblastomu, do kterého jejich onemocnění nakonec postoupilo. Pacientka č.7 vykazovala spíše znaky ‚pravého‘ *IDH*-wt astrocytomu v každém jejím odběru. Pacient č.20 je zajímavý, jelikož jediný nález v obou vzorcích byl detekován pomocí (MS-)MLPA – v diagnostickém vzorku byla detekována delece *CDKN2A/B* genu a hypermetylace *pMGMT* a ve vzorku z druhého odběru byla detekována znovu pouze hypermetylace. Při obou odběrech byl nádor histologicky určen jako astrocytom druhého stupně. Výsledky pacienta č.20 tedy považujeme za neinformativní.

Hypermetylace *pMLH3* byla detekována čtyřikrát v diagnostických vzorcích (1A, 8A, 10A a 25A) a to současně s mutací v *IDHI* genu. U všech těchto pacientů byl diagnostický vzorek histologicky určen jako astrocytom druhého stupně. Znovu se hypermetylace *pMLH3* potvrdila jen u pacientky č.1 při opakovaném odběru, zatímco při opakovaných odběrech pacientů č.8, 10 a 25, kdy onemocnění postoupilo do vyšších stupňů, hypermetylace vymizela. Tento nález je konzistentní s výsledky skupiny Lhotská a spol., která pozorovala tuto metylaci u gliomů nižších stupňů vždy zároveň s mutovaným *IDHI* (Lhotská et al. 2015). Mnohem častěji hypermetylovaným promotorem byl *pMGMT*, který byl detekován v 86% diagnostických vzorcích a ve všech vzorcích z opakovaných odběrů (nepočítaje pacienta č. 20). Tento nález je

v souladu s literaturou, která určuje hypermetylaci *pMGMT* jako častou a brzkou událost ve vývoji astrocytomů druhých a třetích stupňů (Groenendijk et al. 2011). K celogenomovým změnám metylace DNA dochází díky akumulaci 2-HG v důsledku mutovaného *IDH1* genu (Malta et al. 2018).

Častým nálezem ve skupině astrocytomů byla segmentální uniparentální dizomie na chromozomu 17. UPD krátkého ramena chromozomu 17 je považována za jeden z možných mechanismů, který dokáže spouštět a podporovat růst nádoru. Může způsobit duplikaci původně heterozygotní mutace, a to vede buď k inaktivaci tumor supresorového genu, nebo k přítomnosti dvou kopií mutovaného onkogenu. Jedním z takových genů je *TP53* (17p13.1). Rozrušení genové dráhy *TP53* je obvykle jednou z prvních událostí v procesu vzniku difúzních astrocytomů (Lhotská et al. 2014). Toto bylo také potvrzeno - segmentální UPD byla detekována primárně v diagnostických odběrech nemocných. Mezi časté rekurentní aberace se také řadily zisky chromozomu 7 a ztráty chromozomu 10. Současné zisky chromozomu 7 se ztrátami chromozomu 10 (i částečné) jsou asociovány s gliomy vyšších stupňů, nejčastěji s *IDH*-wt glioblastomy (Stichel et al. 2018).

Byly identifikovány rekurentní aberace nalezené při progresi onemocnění. Jednalo se o aberace na chromozomech 5, 9, 11, 13, 15, 16 a 22. Na chromozomu 5 byly při progresi onemocnění nalezeny akumulované zisky na krátkém ramenu s minimální zasaženou oblastí 15p15.33p13.3. V této oblasti se nachází onkogen *TERT* (15p13.33) kódující podjednotku telomerázy. Ta se podílí na údržbě telomer a v mnoha malignitách, včetně difúzních gliomů, je její exprese zvýšena v důsledku bodových mutací promotoru tohoto genu (Powter et al. 2021). V této studii nebyl mutační stav *pTERT* vyšetřován, ale rekurentní amplifikace tohoto regionu ve vzorcích z opakovaných odběrů může naznačovat jejich úlohu v maligním vývoji astrocytomů.

Na chromozomu 5 byly dále často detekovány ztráty na dlouhém ramenu. K nejčastějším ztrátám docházelo na minimální zasažené oblasti v rozsahu 5q23q31. Hemizygotní intersticiální delece na 5q jsou častým nálezem například u hematologických malignit s kritickým deletovaným regionem obsahující gen *RPS14*. *RPS14* je haploinsuficientní gen, který kóduje protein účastnící se biogeneze ribozomů a jeho absence ústí v tvorbu komplexu MDM2 (double minute mouse E3 ubiquitin ligáza)-RP (ribozomální protein). Tvorba tohoto komplexu způsobí akumulaci proteinu p53, což vede k aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu, senescenci anebo apoptóze (Hurtado et al. 2023). Nález deletovaného genu *RPS14* při

progresi astrocytomů je v rozporu s literaturou, jelikož z výsledků recentní publikace vyplývá, že *RPS14* je často v gliomech nacházen se zvýšenou expresí a aktivitou. Skupina Hu et al. dále tvrdí, že jeho umlčení naopak přispívá k inhibici růstu gliomů *in vivo* a *RPS14* by tak mohl být považován za potenciální cíl vývoje léčby gliomů (Hu et al. 2023). Do oblasti 5q31 lokalizují další kandidátní geny asociovány s malignitami - *EGRI*, *CTNNA1*, *CDKL3*, *PDGFRA/B* a cluster genů kódující interleukiny (Ebert 2009). Monoalelická ztráta jednoho z těchto genů současně s rozrušením druhé alely („two-hit model“) v důsledku mutací či epigenetických změn v průběhu evoluce nádoru může mít vliv na další maligní vývoj onemocnění.

Na krátkém ramenu chromozomu 9 se s progresí onemocnění akumulovaly ztráty identických oblastí předešle detekovaných v diagnostických vzorcích. Jednalo se primárně o ztráty lokusu *CDKN2A/B*. Tento nález souhlasí s literaturou a ztráta lokusu *CDKN2A/B* je asociovaná s agresivním onemocněním a progresí nádoru (Louis et al. 2021). Na dlouhém rameni chromozomu 9 byly s progresí nádoru detekovány rekurentní terminální zisky minimální zasažené oblasti 9q34.1q34.3. Do tohoto regionu lokalizují dva potenciální geny asociované s progresí malignity – *NOTCH1* a *ABL1*. *NOTCH1* kóduje transmembránový protein účastnící se regulace buněčné diferenciace a proliferace. *NOTCH1* byl nalezen ve vzorcích glioblastomů a jeho zvýšená aktivita je asociovaná s agresivní invazí nádorových buněk díky signalizaci skrz PI3K dráhu (Yi et al. 2019). Gen *ABL1* kóduje tyrozin kinázu a v malignitách je často nacházen při reciproké translokaci t(9,22), která ústí v typickou hematologickou fúzi genů *BCR-ABL1*. Tato fúze byla nalezena v případě glioblastomu pouze jedenkrát. Publikace zdůrazňuje důležitost detekce fúzních onkoproteinů v gliomech jako potenciální oblast vývoje nových cílených léků (Pang et al. 2021). Kinázy z rodiny ABL (Abelson) podporují růst a metastáze v mnoha solidních nádorech, kde jsou často aberantně aktivovány (Luttman et al. 2021). Zisky v oblasti genu *ABL1* by tedy mohly být asociovány s patogenezí a progresí gliomů.

Dalším chromozomem, na kterém se akumulovaly aberace při progresi onemocnění, byl chromozom 11, konkrétně jeho dlouhé rameno. Detekce rekurentních ztrát na krátkém ramenu chromozomu 11 (primárně na terminální oblasti) jak v diagnostických vzorcích, tak při opakovaných odběrech, naznačuje, že by se mohlo jednat o brzké události v evoluci nádoru. Tento nález souhlasí s publikacemi, které asociují ztráty na 11p s nízkostupňovými gliomy (Fulst et al. 1992; Alentorn et al. 2014). Rameno 11q akumulovalo ztráty s minimální zasaženou oblastí o rozsahu 11q14.1q21. Dvakrát byla detekována ztráta celého dlouhého ramena. Delece

na 11q jsou dlouhodobě pozorovanými rekurentními aberacemi v nádorových buňkách neuroblastomů (extrakraniální solidní nádory dětí), nicméně se zatím nepodařilo definovat možné tumor supresorové geny v této oblasti, které by mohly být delecemi ovlivněny (Mlakar et al. 2017). Jedenkrát byl při progresi nádoru detekován také zisk téměř celého 11q. V tomto kontextu se nabízí onkogen *CCND1* kódující protein cyklin D1, který podporuje průchod buněčným cyklem a tím tak proliferaci. V literatuře je přítomnost a role v gliomagenezí amplifikovaného *CCND1* známá (Büsches et al. 1999).

Chromozom 13 při progresi onemocnění akumuloval primárně ztráty s minimální zasaženou oblastí o rozsahu 13q21.1q21.33. Dvakrát byla také detekována monozomie chromozomu 13. Na chromozomu 13 se nachází tumor supresorový gen *RBI*, který hraje roli v několika významných buněčných procesech jako je regulace buněčného cyklu, opravy poškození DNA a regulace transkripce, a popsal ho již Alfred Knudson v 70. letech (Knudson 1971). Mezi hlavní aberace genu *RBI* v gliomech patří bodové mutace, nicméně znovu se zde může uplatnit dříve zmiňovaný ‚two-hit‘ model. Recentní literatura navrhuje možnost zaměření cílené léčby na downstream dráhy a molekuly genu *RBI* v malignitách, které tento gen ztratily (Huang et al. 2024). Nabytí této aberace s progresí onemocnění může dále přispívat k chromozomové nestabilitě, tj. přítomnosti numerických a strukturních aberací, v nádorových buňkách gliomu. Přestože v recentní aktualizované klasifikaci nádorů CNS chromozomová nestabilita zatím není inkorporována jako prognostický faktor, v solidních nádorech je chromozomová nestabilita známým faktorem podporující malignitu (Richardson et al. 2022).

Na chromozomu 15 se s progresí onemocnění akumulovaly ztráty často téměř celého chromozomu. Nejmenší společná zasažená oblast byla 15q15.1q21.1. Ztráty celého chromozomu 15 byly detekovány v nádorech třetího a čtvrtého stupně a mohou značit důsledek rostoucí genomové nestability při progresi onemocnění. V oblasti 15q15.1 se nabízí gen *RAD51*, jehož kódovaný protein se účastní procesů homologní rekombinace při opravě dvouvláknových zlomů na DNA, a je považován za tumor supresorový gen. Role *RAD51* v patogenezi gliomů se zdá být kontroverzní. Ve studii zaměřující se na hladiny mRNA *RAD51* nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi vzorky astrocytomů a zdravé mozkové tkáně (Zheng et al. 2006). Naopak studie exprese proteinu Rad51 ve vzorcích glioblastomu při diagnóze a při recidivě onemocnění našla zvýšenou hladinu exprese, která korelovala se zvýšenou délkou přežití nemocných (Welsh et al. 2009). Náš nálezn je nicméně v souladu se studií, která

detekovala region kratšího rozsahu (stále zasahující *RAD51* gen) v delecii u skupiny vzorků gliomů (Bredel et al. 2005).

Další ztráty se s progresí onemocnění akumulovaly také na chromozomu 16 a 22. Na 16q byly také detekovány oblasti se ztrátou heterozygotnosti. Ztráty 16q jsou častým nálezem např. u malignit prsu (Rakha et al. 2006). V případě difúzních gliomů jsou delece na 16q v literatuře málo zmiňovaným nálezem, zatímco ztráty chromozomu 22 jsou již dlouho známým fenoménem asociovaným s progresí onemocnění (Laigle-Donadey et al. 2006). V naší studii byly ztráty celého chromozomu 16 detekovány u astrocytomů třetího a čtvrtého stupně. Molekulární profil těchto entit se zdá být velmi variabilní a tyto aberace mohou být považovány za důsledek rostoucí genomické nestability v nádorových buňkách gliomu s progresí onemocnění. Celková úroveň změn v počtu kopií (CNV) se totiž u *IDH*-mutantních difúzních astrocytomů zvyšuje s rostoucím WHO stupněm malignity (Richardson et al. 2022).

**Oligodendrogliomy:** Skupina nemocných s oligodendrogliomy obsahovala pouze čtyři pacienty s dvěma odběry v průběhu jejich onemocnění. V této skupině vykazovali lineární klonální evoluci jejich nádorů všichni nemocní. Oligodendrogliomy jsou definovány *IDH1* mutací a kodeleci 1p/19q. Mutace v *IDH1* genu byla potvrzena u tří ze čtyř vyšetřovaných. U některých z nich by tento nález zvýšil původní histologicky určený stupeň nádoru z druhého na třetí. U pacientky bez *IDH1* mutace (č.5) došlo k progresi onemocnění do glioblastomu čtvrtého stupně. S diagnózou glioblastomu, *IDH*-wildtype, čtvrtého stupně koreloval také nález zisku chromozomu 7, ztráty chromozomu 10, delece lokusu *CDKN2A/B* a hypermetylace *pMGMT* při progresi onemocnění této pacientky.

Kodelece 1p/19q byla detekována u všech nemocných této skupiny, čímž byla potvrzena histologická diagnóza. Tato kodelece je významným diagnostickým ukazatelem pro oligodendrogliomy a je asociována se zlepšeným přežitím nemocných (Louis et al. 2021). Metodou I-FISH byla kodelece potvrzena pouze dvakrát. Vysvětlením může být heterogenita nádoru a nepřítomnost klonů s kodeleci ve vyšetřovaném vzorku připraveném pro metodu I-FISH.

Častým nálezem byla také hypermetylace *pMGMT* (u všech odběrů všech nemocných s výjimkou diagnostického odběru pacientky č.5). Tento nález je také v souladu s literaturou (Wesseling et al. 2015).

V této skupině byly s progresí onemocnění detekovány rekurentní aberace roztroušené po genomu. Jednalo se o zisky a ztráty různých rozsahů na chromozomech 1q, 3, 4q, 5q, 6q, 7, 8q, 9p, 10, 11, 13, 14, 15, 16q, 17p a 18. Delece na 9p, 13q a monozomie chromozomu 18, které jsme detekovali v této skupině až s progresí onemocnění, byly laboratoří CNC popsány dříve u nízko stupňových oligodendrogliomů (Lhotská et al. 2014). Chromozom 15 byl detekován v monozomickém stavu u tří nemocných při progresi jejich onemocnění. Zde znovu může hrát roli již zmiňovaný tumor supresor *RAD51*.

**Primární glioblastomy:** Ve skupině nemocných s primárním glioblastomem bylo vyšetřeno sedm pacientů s dvěma odběry v průběhu jejich onemocnění. Tento subtyp difúzních gliomů dospělých je vysoce agresivní a invazivní malignita. Mechanismy stojící za iniciací a relapsem tumoru stále čekají na objasnění. V klonální evoluci glioblastomu hraje roli nepřeborné množství molekulárních drah a nádor se vyznačuje škálou histologických a genetických znaků. Zároveň tento subtyp vykazuje největší variabilitu genetické výbavy vzorků ze středu nádoru a z jeho periferie nebo vzorků z hypoxických a ne-hypoxických oblastí, což naznačuje, že intratumorová heterogenita se bude lišit také mezi primárním a recidivujícím glioblastomem (Campos et al. 2016).

Mezi hlavní ukazatele primárního glioblastomu patří nemutovaný *IDH* gen, současná aneuploidie +7/-10 a amplifikace *EGFR* genu (Louis et al. 2021). Tyto aberace byly u vyšetřovaných sledovány. Dle předpokladů byly metodou I-FISH nejčastější patologické nálezy detekovány pomocí DNA sond *XL EGFR amp* a *LSI PTEN (10q23) / CEP 10*. Jednalo se o současné zisky chromozomu 7 se ztrátou chromozomu 10, amplifikace *EGFR* genu a bialelické ztráty *PTEN* genu. Současná aneuploidie +7/-10 byla detekována ve všech vzorcích s výjimkou pacienta č.21. U tohoto pacienta byl metodou I-FISH zjištěn pouze nízkofrekvenční klon s trizomií 7, zatímco vyšetření aCGH/SNP potvrdilo v obou odběrech komplexní genetické změny včetně zisků na chromozomu 7 a ztrát na chromozomu 10. V archivovaném vzorku tohoto pacienta, který byl využit pro přípravu suspenze pro vyšetření I-FISH, pravděpodobně nebylo dostatečné množství reprezentativních nádorových gliálních buněk.

Trizomie 7 a monozomie 10 byly rekurentním nálezem také při vyšetření aCGH/SNP jak v diagnostických, tak ve vzorcích z opakovaných odběrů. Tato současná aneuploidie +7/-10 vznikající důsledkem mitotické nondisjunkce (Stichel et al. 2018) je pravděpodobně součástí společné dráhy vývoje glioblastomu, která dále predisponuje k alternacím genu *PTEN* a dalším



aktivujícím mutacím či amplifikacím ve významných onkogenech (Kim et al. 2015). Ztráty chromozomu 10 přispívají dále k amplifikaci a aktivaci signální dráhy EGFR v důsledku ztráty haploinsuficientního genu *ANXA7* (anexin A7), což dodává glioblastomovým buňkám větší maligní potenciál (Yadav et al. 2009).

Výsledky (MS-)MLPA ukazují nepřítomnost mutace *IDH1* v této skupině vyšetřovaných, což potvrdilo jejich diagnózu glioblastomu čtvrtého stupně, *IDH*-wildtype. Dále, hypermetylace *pMGMT* byla prokázána pouze dvakrát v diagnostických vzorcích a třikrát při progresi onemocnění. Metylační status *pMGMT* je asociován se senzitivitou tumoru k léčbě alkylačními činidly. Tento málo frekventovaný nález hypermetylace *pMGMT* je konzistentní s literaturou, jelikož tato epigenetická aberace je asociovaná primárně s nízkostupňovými astrocytomy jako brzká událost v jejich evoluci (Groenendijk et al. 2011).

Výsledky aCGH/SNP ukazují genetické aberace na všech chromozomech jak při diagnóze, tak při progresi onemocnění. Typická homozygotní delece lokusu *CDKN2A* byla detekována v 57% případů primárních glioblastomů. Mezi rekurentní aberace patřily například aneuploidie celých chromozomů. Mimo již zmiňované současné aneuploidie +7/-10 se jednalo o trizomie chromozomu 19 a monozomie chromozomů 13 a 14. Aneuploidie mohou být dalším důsledkem nestability genomu, jakožto významného znaku nádorových buněk. Výsledky nicméně jednoznačně nenaznačovaly kandidátní aberace, které by mohly být asociované s progresí onemocnění. Naopak výsledky naznačovaly trend ztrát některých původních aberací. Tomuto předpokladu odpovídá recentní literatura, která uvádí masivní vymírání původních iniciujících klonů již v brzy v evoluci glioblastomu (Ceresa et al. 2023).

Při porovnání genetických profilů primárních glioblastomů při první resekci a při progresi onemocnění byla všem nádorům určena divergentní klonální evoluce. Klonální vývoj primárního glioblastomu při relapsu onemocnění naznačuje tři různé vzory evoluce: a) dominantní velké subklony z primárního nádoru jsou v recidivě menší nebo přímo eliminované, b) dominantní subklony přežijí léčbu a znovu se objeví jako dominantní subklony v recidivě nebo c) léčbu přežijí menší subklony a v recidivujícím nádoru se objeví jako dominantní subklony (Andor et al. 2014). Poznatky z pozdější literatury naznačují, že recidivující tumor pochází z původní malé a nedominantní populace buněk, která nebyla detekována v diagnostických vzorcích při první resekci pacienta (Baysan et al. 2017). Kim et al. také odhalili absenci původních genetických aberací v recidivujících nádorech (H. Kim et al. 2015).

## 11. Souhrn

Cílem diplomové práce bylo předložit porovnání genomových profilů primárních a recidivujících mozkových nádorů dospělých a popsat potenciální kandidátní aberace se vztahem k progresi. Na základě výsledků bylo cílem popsat klonální vývoj vyšetřovaných difúzních gliomů v průběhu onemocnění.

**Add1.** V této studii bylo vyšetřeno 26 nemocných s histologicky potvrzeným difúzním gliomem. U každého pacienta byly k dispozici nejméně dva vzorky nádorové tkáně z průběhu onemocnění. Vyšetřovaný soubor byl rozdělen do tří skupin dle diagnózy při první chirurgické resekci. Pro vyšetření genetického a epigenetického profilu nádorů byly použity metody I-FISH, (MS-)MLPA a aCGH/SNP array pro všechny odběry nemocných. Díky získaným datům bylo provedeno porovnání diagnostických vzorků a vzorků z opakovaných odběrů pro každou skupinu subtypu difúzních gliomů. Skupina nemocných s astrocytomy byla nejpočetnější a byly zde popsány kandidátní rekurentní aberace, které by mohly být asociovány s progresí onemocnění. Skupina nemocných s oligodendrogliomy obsahovala pouze čtyři pacienty. U této skupiny byla histologická diagnóza potvrzena detekovanými genetickými aberacemi, nicméně výsledky nenaznačovaly přítomnost rekurentních aberací se vztahem k progresi onemocnění. Skupina primárních glioblastomů se sedmi pacienty vykazovala nejvýraznější variabilitu v detekovaných genetických aberacích. Jak v diagnostických vzorcích, tak ve vzorcích z opakovaných odběrů byly v této skupině detekovány rekurentní a významné aberace, jež jsou v literatuře známé.

**Add2.** Díky genomovým profilům primárních a recidivujících nádorů byl možné každému pacientovi přiřadit typ klonálního vývoje. Bylo detekováno celkem šest pacientů s lineární evolucí a dvacet pacientů s divergentním typem evoluce. Lineární klonální vývoj byl dominantním typem u skupiny nemocných s oligodendrogliomem a divergentní evoluce převažovala u astrocytomů a primárních glioblastomů.

## 12. Seznam použité literatury

- Agrawal, Anshu, Jianhui Yang, Richard F. Murphy, a Devendra K. Agrawal. 2006. „Regulation of the p14ARF-Mdm2-P53 Pathway: An Overview in Breast Cancer". *Experimental and Molecular Pathology* 81(2): 115–22. doi:10.1016/j.yexmp.2006.07.001.
- Aguilera, Paula, a Andrés J. López-Contreras. 2023. „ATR-X, a Guardian of Chromatin". *Trends in genetics: TIG* 39(6): 505–19. doi:10.1016/j.tig.2023.02.009.
- Aldape, Kenneth, Gelareh Zadeh, Sheila Mansouri, Guido Reifenberger, a Andreas von Deimling. 2015. „Glioblastoma: Pathology, Molecular Mechanisms and Markers". *Acta Neuropathologica* 129(6): 829–48. doi:10.1007/s00401-015-1432-1.
- Alentorn, Agustí, Hinke F. van Thuijl, Yannick Marie, Hussa Alshehhi, Catherine Carpentier, Blandine Boisselier, Florence Laigle-Donadey, et al. 2014. „Clinical value of chromosome arms 19q and 11p losses in low-grade gliomas". *Neuro-Oncology* 16(3): 400–408. doi:10.1093/neuonc/not227.
- Ampie, Leonel, Yael Kusne, a Nader Sanai. 2015. „The Evolving Genomic Landscape of Recurrent Gliomas". *World Neurosurgery* 83(5): 722–23. doi:10.1016/j.wneu.2015.03.004.
- An, Zhenyi, Ozlem Aksoy, Tina Zheng, Qi-Wen Fan, a William A. Weiss. 2018. „Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFRvIII in glioblastoma (GBM): signaling pathways and targeted therapies". *Oncogene* 37(12): 1561–75. doi:10.1038/s41388-017-0045-7.
- Andor, Noemi, Julie V. Harness, Sabine Müller, Hans W. Mewes, a Claudia Petritsch. 2014. „EXPANDS: expanding ploidy and allele frequency on nested subpopulations". *Bioinformatics* 30(1): 50–60. doi:10.1093/bioinformatics/btt622.
- Appay, Romain, Caroline Dehais, Claude-Alain Maurage, Agusti Alentorn, Catherine Carpentier, Carole Colin, François Ducray, et al. 2019. „CDKN2A homozygous deletion is a strong adverse prognosis factor in diffuse malignant IDH-mutant gliomas". *Neuro-Oncology* 21(12): 1519–28. doi:10.1093/neuonc/noz124.
- Bao, Zhaoshi, Yongzhi Wang, Qiangwei Wang, Shengyu Fang, Xia Shan, Jiguang Wang, a Tao Jiang. 2021. „Intratumor Heterogeneity, Microenvironment, and Mechanisms of Drug Resistance in Glioma Recurrence and Evolution". *Frontiers of Medicine* 15(4): 551–61. doi:10.1007/s11684-020-0760-2.
- Barthel, Floris P., Kevin C. Johnson, Frederick S. Varn, Anzhela D. Moskalik, Georgette Tanner, Emre Kocakavuk, Kevin J. Anderson, et al. 2019. „Longitudinal Molecular Trajectories of Diffuse Glioma in Adults". *Nature* 576(7785): 112–20. doi:10.1038/s41586-019-1775-1.
- Baysan, Mehmet, Kevin Woolard, Margaret C. Cam, Wei Zhang, Hua Song, Svetlana Kotliarova, Demosthenes Balamatsias, et al. 2017. „Detailed Longitudinal Sampling of

- Glioma Stem Cells in Situ Reveals Chr7 Gain and Chr10 Loss as Repeated Events in Primary Tumor Formation and Recurrence". *International Journal of Cancer* 141(10): 2002–13. doi:10.1002/ijc.30887.
- van den Bent, Martin J., Marion Smits, Johan M. Kros, a Susan M. Chang. 2017. „Diffuse Infiltrating Oligodendroglioma and Astrocytoma". *Journal of Clinical Oncology* 35(21): 2394–2401. doi:10.1200/JCO.2017.72.6737.
- Bettegowda, Chetan, Nishant Agrawal, Yuchen Jiao, Mark Sausen, Laura D. Wood, Ralph H. Hruban, Fausto J. Rodriguez, et al. 2011. „Mutations in CIC and FUBP1 Contribute to Human Oligodendroglioma". *Science (New York, N.Y.)* 333(6048): 1453–55. doi:10.1126/science.1210557.
- Bigner, Sandra H., Mark R. Matthews, B. K. A. Rasheed, Rodney N. Wiltshire, Henry S. Friedman, Allan H. Friedman, Timothy T. Stenzel, et al. 1999. „Molecular Genetic Aspects of Oligodendrogliomas Including Analysis by Comparative Genomic Hybridization". *The American Journal of Pathology* 155(2): 375–86.
- Biscardi, J. S., M. C. Maa, D. A. Tice, M. E. Cox, T. H. Leu, a S. J. Parsons. 1999. „C-Src-Mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr845 and Tyr1101 Is Associated with Modulation of Receptor Function". *The Journal of Biological Chemistry* 274(12): 8335–43. doi:10.1074/jbc.274.12.8335.
- „Brain Tumor Registry of Japan (2005–2008)". 2017. *Neurologia medico-chirurgica* 57(Suppl 1): s19–102. doi:10.2176/nmc.sup.2017-0001.
- Bray, Sarah J. 2006. „Notch Signalling: A Simple Pathway Becomes Complex". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(9): 678–89. doi:10.1038/nrm2009.
- Bredel, Markus, Claudia Bredel, Dejan Juric, Griffith R. Harsh, Hannes Vogel, Lawrence D. Recht, a Branimir I. Sikic. 2005. „High-Resolution Genome-Wide Mapping of Genetic Alterations in Human Glial Brain Tumors". *Cancer Research* 65(10): 4088–96. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4229.
- Büsches, R., R. G. Weber, B. Actor, P. Lichter, V. P. Collins, a G. Reifenberger. 1999. „Amplification and Expression of Cyclin D Genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in Human Malignant Gliomas". *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 9(3): 435–42; discussion 432-433. doi:10.1111/j.1750-3639.1999.tb00532.x.
- Campos, B., L. R. Olsen, T. Urup, a H. S. Poulsen. 2016. „A Comprehensive Profile of Recurrent Glioblastoma". *Oncogene* 35(45): 5819–25. doi:10.1038/onc.2016.85.
- Ceccarelli, Michele, Floris P. Barthel, Tathiane M. Malta, Thais S. Sabedot, Sofie R. Salama, Bradley A. Murray, Olena Morozova, et al. 2016. „Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma". *Cell* 164(3): 550–63. doi:10.1016/j.cell.2015.12.028.
- Ceresa, Davide, Francesco Alessandrini, Sara Lucchini, Daniela Marubbi, Francesca Piaggio, Jorge Miguel Mena Vera, Isabella Ceccherini, et al. 2023. „Early Clonal Extinction in

- Glioblastoma Progression Revealed by Genetic Barcoding". *Cancer Cell* 41(8): 1466-1479.e9. doi:10.1016/j.ccell.2023.07.001.
- Coward, Jermaine, a Angus Harding. 2014. „Size Does Matter: Why Polyploid Tumor Cells are Critical Drug Targets in the War on Cancer". *Frontiers in Oncology* 4: 123. doi:10.3389/fonc.2014.00123.
- Dang, Lenny, David W. White, Stefan Gross, Bryson D. Bennett, Mark A. Bittinger, Edward M. Driggers, Valeria R. Fantin, et al. 2009. „Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate". *Nature* 462(7274): 739. doi:10.1038/nature08617.
- Ebert, B. L. 2009. „Deletion 5q in Myelodysplastic Syndrome: A Paradigm for the Study of Hemizygous Deletions in Cancer". *Leukemia* 23(7): 1252–56. doi:10.1038/leu.2009.53.
- Ekstrand, A J, N Sugawa, C D James, a V P Collins. 1992. „Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(10): 4309–13. doi:10.1073/pnas.89.10.4309.
- Erenpreisa, Jekaterina, Kristine Salmina, Anda Huna, Thomas R. Jackson, Alejandro Vazquez-Martin, a Mark S. Cragg. 2014. „The “virgin birth”, polyploidy, and the origin of cancer". *Oncoscience* 2(1): 3–14.
- Eskilsson, Eskil, Gro V Røsland, Gergely Solecki, Qianghu Wang, Patrick N Harter, Grazia Graziani, Roel G W Verhaak, et al. 2018. „EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma". *Neuro-Oncology* 20(6): 743–52. doi:10.1093/neuonc/nox191.
- Eskilsson, Eskil, Gro V. Rosland, Krishna M. Talasila, Stian Knappskog, Olivier Keunen, Andrea Sottoriva, Sarah Foerster, et al. 2016. „EGFRvIII Mutations Can Emerge as Late and Heterogenous Events in Glioblastoma Development and Promote Angiogenesis through Src Activation". *Neuro-Oncology* 18(12): 1644–55. doi:10.1093/neuonc/nov113.
- Fults, D., J. Petronio, B. D. Noblett, a C. A. Pedone. 1992. „Chromosome 11p15 Deletions in Human Malignant Astrocytomas and Primitive Neuroectodermal Tumors". *Genomics* 14(3): 799–801. doi:10.1016/s0888-7543(05)80191-0.
- Greaves, Mel, a Carlo C. Maley. 2012. „CLONAL EVOLUTION IN CANCER". *Nature* 481(7381): 306–13. doi:10.1038/nature10762.
- Groenendijk, Floris H., Walter Taal, Hendrikus J. Dubbink, Cathleen R. Haarloo, Mathilde C. Kouwenhoven, Martin J. van den Bent, Johan M. Kros, a Winand N. M. Dinjens. 2011. „MGMT promoter hypermethylation is a frequent, early, and consistent event in astrocytoma progression, and not correlated with TP53 mutation". *Journal of Neuro-Oncology* 101(3): 405–17. doi:10.1007/s11060-010-0274-x.

- Guo, Gao, Ke Gong, Bryan Wohlfeld, Kimmo J. Hatanpaa, Dawen Zhao, a Aryn A. Habib. 2015. „Ligand-Independent EGFR Signaling". *Cancer Research* 75(17): 3436–41. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0989.
- Haase, Santiago, María Belén Garcia-Fabiani, Stephen Carney, David Altshuler, Felipe J. Núñez, Flor M. Méndez, Fernando Núñez, Pedro R. Lowenstein, a Maria G. Castro. 2018. „Mutant ATRX: uncovering a new therapeutic target for glioma". *Expert opinion on therapeutic targets* 22(7): 599–613. doi:10.1080/14728222.2018.1487953.
- Han, Sue, Yang Liu, Sabrina J. Cai, Mingyu Qian, Jianyi Ding, Mioara Larion, Mark R. Gilbert, a Chunzhang Yang. 2020. „IDH Mutation in Glioma: Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Targets". *British Journal of Cancer* 122(11): 1580–89. doi:10.1038/s41416-020-0814-x.
- Han, Woody, a Hui-Wen Lo. 2012. „Landscape of EGFR Signaling Network in Human Cancers: Biology and Therapeutic Response in Relation to Receptor Subcellular Locations". *Cancer Letters* 318(2): 124–34. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.011.
- Hartmann, Christian, Bettina Hentschel, Wolfgang Wick, David Capper, Jörg Felsberg, Matthias Simon, Manfred Westphal, et al. 2010. „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 Neuropathologica* 120(6): 707–18. doi:10.1007/s00401-010-0781-z.
- He, Xu-Dong, Meng-Fang Xia, Ji-Yuan Teng, Bin-Bing S. Zhou, a Qian-Fei Wang. 2023. „Clonal Evolution in Leukemia: Preleukemia, Evolutionary Models, and Clinical Implications". *Genome Instability & Disease* 4(4): 227–38. doi:10.1007/s42764-023-00104-6.
- Hu, Shangwei, Jianhui Cai, Hua Fang, Zhen Chen, Jicai Zhang, a Run Cai. 2023. „RPS14 promotes the development and progression of glioma via p53 signaling pathway". *Experimental Cell Research* 423(1): 113451. doi:10.1016/j.yexcr.2022.113451.
- Huang, Mo-Fan, Yuan-Xin Wang, Yu-Ting Chou, a Dung-Fang Lee. 2024. „Therapeutic Strategies for RB1-Deficient Cancers: Intersecting Gene Regulation and Targeted Therapy". *Cancers* 16(8): 1558. doi:10.3390/cancers16081558.
- Hurtado, Rodrigo, Alexander Ramirez, Leena Nabipur, Josue Flores, a Carlos A. Tirado. 2023. „The Key Role of the RPS14 Gene in Neoplasms and Solid Tumors". *Journal of the Association of Genetic Technologists* 49(3): 121–26.
- Chen, Zhihong, a Dolores Hambarzumyan. 2018. „Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes". *Frontiers in Immunology* 9: 1004. doi:10.3389/fimmu.2018.01004.
- Ichimura, Koichi, Yoshitaka Narita, a Cynthia E. Hawkins. 2015. „Diffusely Infiltrating Astrocytomas: Pathology, Molecular Mechanisms and Markers". *Acta Neuropathologica* 129(6): 789–808. doi:10.1007/s00401-015-1439-7.

- Ichimura, Koichi, Danita M. Pearson, Sylvia Kocialkowski, L. Magnus Bäcklund, Raymond Chan, David T. W. Jones, a V. Peter Collins. 2009. „IDH1 Mutations Are Present in the Majority of Common Adult Gliomas but Rare in Primary Glioblastomas". *Neuro-Oncology* 11(4): 341–47. doi:10.1215/15228517-2009-025.
- Jenkins, Robert B., Hilary Blair, Karla V. Ballman, Caterina Giannini, Robert M. Arusell, Mark Law, Heather Flynn, et al. 2006. „A t(1;19)(q10;p10) Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendroglioma". *Cancer Research* 66(20): 9852–61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1796.
- Jirásek, Tomáš, Lenka Krsková, Iva Dolinová, Marián Švajdler, Aleš Vícha, Markéta Hermanová, a Josef Zámečník. 2022. „News in WHO 2021 Classification of Tumours of the Central Nervous System". *Ceskoslovenska Patologie* 58(3): 126–34.
- Johnson, Brett E., Tali Mazor, Chibo Hong, Michael Barnes, Koki Aihara, Cory Y. McLean, Shaun D. Fouse, et al. 2014. „Mutational Analysis Reveals the Origin and Therapy-Driven Evolution of Recurrent Glioma". *Science (New York, N.Y.)* 343(6167): 189–93. doi:10.1126/science.1239947.
- Kim, Hoon, Siyuan Zheng, Seyed S. Amini, Selene M. Virk, Tom Mikkelsen, Daniel J. Brat, Jonna Grimsby, et al. 2015. „Whole-Genome and Multisector Exome Sequencing of Primary and Post-Treatment Glioblastoma Reveals Patterns of Tumor Evolution". *Genome Research* 25(3): 316–27. doi:10.1101/gr.180612.114.
- Kim, Jinkuk, In-Hee Lee, Hee Jin Cho, Chul-Kee Park, Yang-Soon Jung, Yanghee Kim, So Hee Nam, et al. 2015. „Spatiotemporal Evolution of the Primary Glioblastoma Genome". *Cancer Cell* 28(3): 318–28. doi:10.1016/j.ccell.2015.07.013.
- Kirkpatrick, John P., a John H. Sampson. 2014. „Recurrent Malignant Gliomas". *Seminars in Radiation Oncology* 24(4): 289–98. doi:10.1016/j.semradonc.2014.06.006.
- Kleihues, Paul, David N. Louis, Bernd W. Scheithauer, Lucy B. Rorke, Guido Reifenberger, Peter C. Burger, a Webster K. Cavenee. 2002. „The WHO Classification of Tumors of the Nervous System". *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 61(3): 215–25. doi:10.1093/jnen/61.3.215.
- Knobbe, Christiane B., Adrian Merlo, a Guido Reifenberger. 2002. „Pten Signaling in Gliomas". *Neuro-Oncology* 4(3): 196–211.
- Knudson, Alfred G. 1971. „Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68(4): 820–23. doi:10.1073/pnas.68.4.820.
- Koul, Dimpy. 2008. „PTEN Signaling Pathways in Glioblastoma". *Cancer Biology & Therapy* 7(9): 1321–25. doi:10.4161/cbt.7.9.6954.
- Laigle-Donadey, Florence, Emmanuelle Crinière, Alexandra Benouaich, Emmanuelle Lesueur, Karima Mokhtari, Khe Hoang-Xuan, a Marc Sanson. 2006. „Loss of 22q Chromosome

- Is Related to Glioma Progression and Loss of 10q". *Journal of Neuro-Oncology* 76(3): 265–68. doi:10.1007/s11060-005-7019-2.
- Lakomý, Radek, Tomáš Kazda, a Pavel Šlampa. 2018. *GLIOMY – SOUČASNÁ DIAGNOSTIKA A LÉČBA*, 2. vydání. 2. Praha: Maxdorf, s.r.o.
- Lass, Ulrike, Astrid Nümann, Kajetan von Eckardstein, Jürgen Kiwit, Florian Stockhammer, Jörn A. Horaczek, Julian Veelken, et al. 2012. „Clonal Analysis in Recurrent Astrocytic, Oligoastrocytic and Oligodendroglial Tumors Implicates IDH1- Mutation as Common Tumor Initiating Event". *PLoS ONE* 7(7): e41298. doi:10.1371/journal.pone.0041298.
- Lee, Donghyun D., Martin Komosa, Nuno Miguel Nunes, a Uri Tabori. 2020. „DNA Methylation of the TERT Promoter and Its Impact on Human Cancer". *Current Opinion in Genetics & Development* 60: 17–24. doi:10.1016/j.gde.2020.02.003.
- Lewis, Peter W., Simon J. Elsaesser, Kyung-Min Noh, Sonja C. Stadler, a C. David Allis. 2010. „Daxx Is an H3.3-Specific Histone Chaperone and Cooperates with ATRX in Replication-Independent Chromatin Assembly at Telomeres". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(32): 14075–80. doi:10.1073/pnas.1008850107.
- Lhotská, H., Z. Zemanová, F. Kramář, L. Lizcová, K. Svobodová, S. Ransdorfová, D. Bystřická, et al. 2014. „[Molecular cytogenetic analysis of chromosomal aberrations in cells of low grade gliomas and its contribution for tumour classification]". *Klinická Onkologie: Casopis Ceske a Slovenske Onkologicke Spolecnosti* 27(3): 183–91. doi:10.14735/amko2014183.
- Lhotska, Halka, Zuzana Zemanova, Hana Cechova, Sarka Ransdorfova, Libuse Lizcova, Filip Kramar, Zdenek Krejcik, et al. 2015. „Genetic and Epigenetic Characterization of Low-Grade Gliomas Reveals Frequent Methylation of the LH3 Gene". *Genes, Chromosomes and Cancer* 54(11): 655–67. doi:10.1002/gcc.22266.
- Lhotska, Halka, Zuzana Zemanova, Hana Cechova, Sarka Ransdorfova, Karla Svobodova, Filip Kramar, Zdenek Krejcik, a Kyra Michalova. 2016. „Primary and recurrent diffuse astrocytomas: genomic profile comparison reveals acquisition of biologically relevant aberrations". *Molecular Cytogenetics* 9: 13. doi:10.1186/s13039-016-0222-3.
- Louis, David N., Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, et al. 2016. „The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary". *Acta Neuropathologica* 131(6): 803–20. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
- Louis, David N, Arie Perry, Pieter Wesseling, Daniel J Brat, Ian A Cree, Dominique Figarella-Branger, Cynthia Hawkins, et al. 2021. „The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary". *Neuro-Oncology* 23(8): 1231–51. doi:10.1093/neuonc/noab106.
- Lovejoy, Courtney A., Wendi Li, Steven Reisenweber, Supawat Thongthip, Joanne Bruno, Titia de Lange, Saurav De, et al. 2012. „Loss of ATRX, Genome Instability, and an Altered



- DNA Damage Response Are Hallmarks of the Alternative Lengthening of Telomeres Pathway". *PLoS genetics* 8(7): e1002772. doi:10.1371/journal.pgen.1002772.
- Luttman, Jillian Hattaway, Ashley Colemon, Benjamin Mayro, a Ann Marie Pendergast. 2021. „Role of the ABL tyrosine kinases in the epithelial–mesenchymal transition and the metastatic cascade". *Cell Communication and Signaling* 19(1): 59. doi:10.1186/s12964-021-00739-6.
- Malta, Tathiane M., Camila F. de Souza, Thais S. Sabedot, Tiago C. Silva, Maritza S. Mosella, Steven N. Kalkanis, James Snyder, Ana Valeria B. Castro, a Houtan Noushmehr. 2018. „Glioma CpG Island Methylator Phenotype (G-CIMP): Biological and Clinical Implications". *Neuro-Oncology* 20(5): 608–20. doi:10.1093/neuonc/nox183.
- Mazor, Tali, Aleksandr Pankov, Brett E. Johnson, Chibo Hong, Emily G. Hamilton, Robert J. A. Bell, Ivan V. Smirnov, et al. 2015. „DNA Methylation and Somatic Mutations Converge on the Cell Cycle and Define Similar Evolutionary Histories in Brain Tumors". *Cancer Cell* 28(3): 307–17. doi:10.1016/j.ccell.2015.07.012.
- McLendon, Roger, Allan Friedman, Darrell Bigner, Erwin G. Van Meir, Daniel J. Brat, Gena M. Mastrogiannis, Jeffrey J. Olson, et al. 2008. „Comprehensive Genomic Characterization Defines Human Glioblastoma Genes and Core Pathways". *Nature* 455(7216): 1061–68. doi:10.1038/nature07385.
- Mlakar, Vid, Simona Jurkovic Mlakar, Gonzalo Lopez, John M. Maris, Marc Ansari, a Fabienne Gumy-Pause. 2017. „11q deletion in neuroblastoma: a review of biological and clinical implications". *Molecular Cancer* 16: 114. doi:10.1186/s12943-017-0686-8.
- Moffet, J. J. D., O. E. Fatunla, L. Freytag, J. J. Jones, S. Roberts-Thomson, A. Pavenko, D. Scoville, et al. 2023. „Spatial Architecture of High-Grade Glioma Reveals Tumor Heterogeneity within Distinct Domains". : 2023.03.13.531204. doi:10.1101/2023.03.13.531204.
- Molinaro, Annette M., Jennie W. Taylor, John K. Wiencke, a Margaret R. Wrensch. 2019. „Genetic and Molecular Epidemiology of Adult Diffuse Glioma". *Nature Reviews Neurology* 15(7): 405–17. doi:10.1038/s41582-019-0220-2.
- Nowell, P. C. 1976. „The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations". *Science (New York, N.Y.)* 194(4260): 23–28. doi:10.1126/science.959840.
- Oberoi, Rajneet K., Karen E. Parrish, Terence T. Sio, Rajendar K. Mittapalli, William F. Elmquist, a Jann N. Sarkaria. 2016. „Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood–brain barrier to treat glioblastoma". *Neuro-Oncology* 18(1): 27–36. doi:10.1093/neuonc/nov164.
- Ohgaki, Hiroko, a Paul Kleihues. 2007. „Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma". *The American Journal of Pathology* 170(5): 1445–53. doi:10.2353/ajpath.2007.070011.

- Ohtani, Naoko, Kimi Yamakoshi, Akiko Takahashi, a Eiji Hara. 2004. „The p16INK4a-RB Pathway: Molecular Link between Cellular Senescence and Tumor Suppression". *The journal of medical investigation: JMI* 51(3–4): 146–53. doi:10.2152/jmi.51.146.
- Oprita, Alexandru, Stefania-Carina Baloi, Georgiana-Adeline Staicu, Oana Alexandru, Daniela Elise Tache, Suzana Danoiu, Elena Simona Micu, a Ani-Simona Sevastre. 2021. „Updated Insights on EGFR Signaling Pathways in Glioma". *International Journal of Molecular Sciences* 22(2): 587. doi:10.3390/ijms22020587.
- Ostrom, Quinn T., Luc Bauchet, Faith G. Davis, Isabelle Deltour, James L. Fisher, Chelsea Eastman Langer, Melike Pekmezci, et al. 2014. „The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review". *Neuro-Oncology* 16(7): 896–913. doi:10.1093/neuonc/nou087.
- Ostrom, Quinn T, Maral Adel Fahmideh, David J Cote, Ivo S Muskens, Jeremy M Schraw, Michael E Scheurer, a Melissa L Bondy. 2019. „Risk factors for childhood and adult primary brain tumors". *Neuro-Oncology* 21(11): 1357–75. doi:10.1093/neuonc/noz123.
- Ostrom, Quinn T, Mackenzie Price, Corey Neff, Gino Cioffi, Kristin A Waite, Carol Kruchko, a Jill S Barnholtz-Sloan. 2022. „CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019". *Neuro-Oncology* 24(Suppl 5): v1–95. doi:10.1093/neuonc/noac202.
- Pallud, Johan, Denys Fontaine, Hugues Duffau, Emmanuel Mandonnet, Nader Sanai, Luc Taillandier, Philippe Peruzzi, et al. 2010. „Natural History of Incidental World Health Organization Grade II Gliomas". *Annals of Neurology* 68(5): 727–33. doi:10.1002/ana.22106.
- Pang, Ying, Guangyang Yu, Madison Butler, Sivasish Sindiri, Young K. Song, Jun S. Wei, Xinyu Wen, et al. 2021. „Report of Canonical BCR-ABL1 Fusion in Glioblastoma". *JCO Precision Oncology* 5: PO.20.00519. doi:10.1200/PO.20.00519.
- Parsons, D. Williams, Siân Jones, Xiaosong Zhang, Jimmy Cheng-Ho Lin, Rebecca J. Leary, Philipp Angenendt, Parminder Mankoo, et al. 2008. „An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme". *Science (New York, N.Y.)* 321(5897): 1807. doi:10.1126/science.1164382.
- Peglion, Florent, Lavinia Capuana, Isabelle Perfettini, Laurent Boucontet, Ben Braithwaite, Emma Colucci-Guyon, Emie Quissac, et al. 2022. „PTEN inhibits AMPK to control collective migration". *Nature Communications* 13: 4528. doi:10.1038/s41467-022-31842-y.
- Petruželka, L., a B. Konopásek. 2003. *Klinická onkologie*. Karolinum.
- Picketts, D. J., D. R. Higgs, S. Bachoo, D. J. Blake, O. W. Quarrell, a R. J. Gibbons. 1996. „ATRX Encodes a Novel Member of the SNF2 Family of Proteins: Mutations Point to a Common Mechanism Underlying the ATR-X Syndrome". *Human Molecular Genetics* 5(12): 1899–1907. doi:10.1093/hmg/5.12.1899.

- Powter, Branka, Sarah A. Jeffreys, Heena Sareen, Adam Cooper, Daniel Brungs, Joseph Po, Tara Roberts, et al. 2021. „Human TERT Promoter Mutations as a Prognostic Biomarker in Glioma". *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 147(4): 1007–17. doi:10.1007/s00432-021-03536-3.
- Qian, Xu, Xinjian Li, Zhumei Shi, Yan Xia, Qingsong Cai, Daqian Xu, Lin Tan, et al. 2019. „PTEN Suppresses Glycolysis by Dephosphorylating and Inhibiting Autophosphorylated PGK1". *Molecular Cell* 76(3): 516-527.e7. doi:10.1016/j.molcel.2019.08.006.
- Rakha, Emad A., Andrew R. Green, Des G. Powe, Rebecca Roylance, a Ian O. Ellis. 2006. „Chromosome 16 Tumor-Suppressor Genes in Breast Cancer". *Genes, Chromosomes and Cancer* 45(6): 527–35. doi:10.1002/gcc.20318.
- Raza, Shaan M., Frederick F. Lang, Bharat B. Aggarwal, Gregory N. Fuller, David M. Wildrick, a Raymond Sawaya. 2002. „Necrosis and Glioblastoma: A Friend or a Foe? A Review and a Hypothesis". *Neurosurgery* 51(1): 2.
- Reifenberger, J., G. Reifenberger, L. Liu, C. D. James, W. Wechsler, a V. P. Collins. 1994. „Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p." *The American Journal of Pathology* 145(5): 1175–90.
- Rice, Terri, Daniel H. Lachance, Annette M. Molinaro, Jeanette E. Eckel-Passow, Kyle M. Walsh, Jill Barnholtz-Sloan, Quinn T. Ostrom, et al. 2016. „Understanding inherited genetic risk of adult glioma – a review". *Neuro-Oncology Practice* 3(1): 10–16. doi:10.1093/nop/npv026.
- Riemenschneider, Markus J., Monika E. Hegi, a Guido Reifenberger. 2010. „MGMT Promoter Methylation in Malignant Gliomas". *Targeted Oncology* 5(3): 161–65. doi:10.1007/s11523-010-0153-6.
- Richardson, Timothy E, Kimmo J Hatanpaa, a Jamie M Walker. 2021. „Molecular Characterization of “True” Low-Grade IDH-Wildtype Astrocytomas". *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 80(5): 431–35. doi:10.1093/jnen/nlab023.
- Richardson, Timothy E., Jamie M. Walker, Kalil G. Abdullah, Samuel K. McBrayer, Mariano S. Viapiano, Zarmeen M. Mussa, Nadejda M. Tsankova, Matija Snuderl, a Kimmo J. Hatanpaa. 2022. „Chromosomal instability in adult-type diffuse gliomas". *Acta Neuropathologica Communications* 10: 115. doi:10.1186/s40478-022-01420-w.
- Schlessinger, Joseph. 2000. „Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases". *Cell* 103(2): 211–25. doi:10.1016/S0092-8674(00)00114-8.
- Stichel, Damian, Azadeh Ebrahimi, David Reuss, Daniel Schrimpf, Takahiro Ono, Mitsuaki Shirahata, Guido Reifenberger, et al. 2018. „Distribution of EGFR Amplification, Combined Chromosome 7 Gain and Chromosome 10 Loss, and TERT Promoter Mutation in Brain Tumors and Their Potential for the Reclassification of IDHwt Astrocytoma to Glioblastoma". *Acta Neuropathologica* 136(5): 793–803. doi:10.1007/s00401-018-1905-0.

- Stott, F. J., S. Bates, M. C. James, B. B. McConnell, M. Starborg, S. Brookes, I. Palmero, et al. 1998. „The Alternative Product from the Human CDKN2A Locus, P14(ARF), Participates in a Regulatory Feedback Loop with P53 and MDM2." *The EMBO Journal* 17(17): 5001. doi:10.1093/emboj/17.17.5001.
- Thakur, Amandeep, Chetna Faujdar, Ram Sharma, Sachin Sharma, Basant Malik, Kunal Nepali, a Jing Ping Liou. 2022. „Glioblastoma: Current Status, Emerging Targets, and Recent Advances". *Journal of Medicinal Chemistry* 65(13): 8596–8685. doi:10.1021/acs.jmedchem.1c01946.
- Thiel, Gundula, Tanka Losanowa, Dieter Kintzel, Gunter Nisch, Hubert Martin, Klaus Vorpahl, a Regine Witkowski. 1992. „Karyotypes in 90 human gliomas". *Cancer Genetics and Cytogenetics* 58(2): 109–20. doi:10.1016/0165-4608(92)90095-P.
- Varela, Maria Luisa, Andrea Comba, Syed M Faisal, Anna Argento, Andrea Franson, Marcus N Barissi, Sean Sachdev, Maria G Castro, a Pedro R Lowenstein. 2023. „Gene Therapy for High Grade Glioma: The Clinical Experience". *Expert opinion on biological therapy* 23(2): 145–61. doi:10.1080/14712598.2022.2157718.
- Verhaak, Roel G. W., Katherine A. Hoadley, Elizabeth Purdom, Victoria Wang, Yuan Qi, Matthew D. Wilkerson, C. Ryan Miller, et al. 2010. „Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1". *Cancer Cell* 17(1): 98–110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020.
- Weber, R. G., M. Sabel, J. Reifenberger, C. Sommer, J. Oberstrass, G. Reifenberger, M. Kiessling, a T. Cremer. 1996. „Characterization of Genomic Alterations Associated with Glioma Progression by Comparative Genomic Hybridization". *Oncogene* 13(5): 983–94.
- Weller, Michael, Martin van den Bent, Matthias Preusser, Emilie Le Rhun, Jörg C. Tonn, Giuseppe Minniti, Martin Bendszus, et al. 2021. „EANO Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Diffuse Gliomas of Adulthood". *Nature Reviews Clinical Oncology* 18(3): 170–86. doi:10.1038/s41571-020-00447-z.
- Welsh, James W., Ron K. Ellsworth, Rachit Kumar, Kyle Fjerstad, Jesse Martinez, Raymond B. Nagel, Jennifer Eschbacher, a Baldassarre Stea. 2009. „Rad51 Protein Expression and Survival in Patients with Glioblastoma Multiforme". *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 74(4): 1251–55. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.03.018.
- Wesseling, Pieter, Martin van den Bent, a Arie Perry. 2015. „Oligodendroglioma: Pathology, Molecular Mechanisms and Markers". *Acta Neuropathologica* 129(6): 809–27. doi:10.1007/s00401-015-1424-1.
- Wick, Wolfgang, Michael Weller, Martin van den Bent, Marc Sanson, Markus Weiler, Andreas von Deimling, Christoph Plass, et al. 2014. „MGMT Testing--the Challenges for Biomarker-Based Glioma Treatment". *Nature Reviews. Neurology* 10(7): 372–85. doi:10.1038/nrneurol.2014.100.

- Xu, Wei, Hui Yang, Ying Liu, Ying Yang, Ping Wang, Se-Hee Kim, Shinsuke Ito, et al. 2011. „Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of  $\alpha$ -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases". *Cancer cell* 19(1): 17–30. doi:10.1016/j.ccr.2010.12.014.
- Yadav, Ajay K., Jaclyn J. Renfrow, Denise M. Scholtens, Hehuang Xie, George E. Duran, Claudia Bredel, Hannes Vogel, et al. 2009. „Monosomy of Chromosome 10 Associated With Dysregulation of Epidermal Growth Factor Signaling in Glioblastomas". *JAMA : the journal of the American Medical Association* 302(3): 276–89. doi:10.1001/jama.2009.1022.
- Yan, Hai, D. Williams Parsons, Genglin Jin, Roger McLendon, B. Ahmed Rasheed, Weishi Yuan, Ivan Kos, et al. 2009. „IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas". *The New England Journal of Medicine* 360(8): 765–73. doi:10.1056/NEJMoa0808710.
- Yi, Li, Xingchen Zhou, Tao Li, Peidong Liu, Long Hai, Luqing Tong, Haiwen Ma, et al. 2019. „Notch1 signaling pathway promotes invasion, self-renewal and growth of glioma initiating cells via modulating chemokine system CXCL12/CXCR4". *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 38: 339. doi:10.1186/s13046-019-1319-4.
- Yuan, Yang, Chen Qi, Gou Maling, Wang Xiang, Liu Yanhui, Liang Ruofei, Mao Yunhe, Luo Jiewen, a Mao Qing. 2016. „TERT Mutation in Glioma: Frequency, Prognosis and Risk". *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 26: 57–62. doi:10.1016/j.jocn.2015.05.066.
- Zemanová, Zuzana, Filip Kramář, L. Babická, Š. Randsdorfová, J. Melicherčíková, P. Hrabal, P. Kozler, a K. Michalová. 2006. „Molecular cytogenetic stratification of recurrent oligodendrogliomas: utility of interphase fluorescence in situ hybridization (I-FISH)". *Folia Biologica* (52): 71–78.
- Zhao, Shimin, Yan Lin, Wei Xu, Wenqing Jiang, Zhengyu Zha, Pu Wang, Wei Yu, et al. 2009. „Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1 $\alpha$ ". *Science (New York, N.Y.)* 324(5924): 261–65. doi:10.1126/science.1170944.
- Zheng, Jiang, Hu Jin, Li Xingang, Jiang Yuquan, Zhou Wei, a Lu Daru. 2006. „Expression analyses of 27 DNA repair genes in astrocytoma by TaqMan low-density array". *Neuroscience Letters* 409(2): 112–17. doi:10.1016/j.neulet.2006.09.038.

## 11. PŘÍLOHA DIPLOMOVÉ PRÁCE

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
1A	Fibrilární astrocytom	2	<p><b>del(1)(p36.22pter), del(11)(p15.4pter), add(12)(p11.2pter), del(13)(q11q22.3), add(20)(p11.1pter), cnLOH(12)(q12q13.13)</b></p> <p>cnLOH(17)(p11.1pter)  mutace <i>IDH1</i> (R132C)  delece <i>CDKN2A/B</i>  hypermetylace <i>pMGMT</i> (49%), <i>hypermetylace pMLH3</i> (48%)</p>
1B	Anaplastický astrocytom	3	<p>cnLOH(17)(pterp11.2)  mutace <i>IDH1</i> (R132C)  delece <i>CDKN2A/B</i>  hypermetylace <i>pMGMT</i> (27%), <i>hypermetylace pMLH3</i> (88%)</p> <p><b>del(2)(q24.2qter), del(3)(q21.1q21.3), del(5)(pterp15.2), add(8)(q23.3qter), del(9)(pterp13.1)(q21.2q21.2)(q31.3q33.3)(q34.13qter), del(10)(pterp15.3), add(12)(q22q24.31), del(18)(q23.3qter), del(X)(pterp22.2)(q13.2q21.33)(q24qter); cnLOH(1)(pterp11.1), cnLOH(3)(p11.1q21.1)(q21.3q29), cnLOH(5)(q11.1qter), cnLOH(6)(q11.1qter), cnLOH(7)(pterp14.3), cnLOH(9)(q21.11q21.2)(q21.2q31.3)(q33.3q34.13), cnLOH(X)(p22.12p21.3)(p11.4p11.22)(q21.33q24)</b></p>
2A	Difúzní astrocytom	2	<p><b>del(11)(p12pter)</b></p> <p>del(1)(p11.1pter), del(19)(q12qter)  mutace <i>IDH1</i> (R132H)  hypermetylace <i>pMGMT</i> (42%)</p>
2B	Sekundární glioblastom	4	<p>del(1)(p11.1pter), del(19)(q13.11q15.3)  mutace <i>IDH1</i> (R132H)  hypermetylace <i>pMGMT</i> (86%)</p> <p><b>del(9)(q21.11q33.3)(q33.3q34.3), -11, -15, -16, cnLOH(17)</b>  hypermetylace <i>pMLH3</i> (46%)</p>

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
2C	Difúzní astrocytom	2	<p>del(1)(p11.1pter), del(11)(pterp11.2), del(19)(q11qter)  mutace <i>IDH1</i> (R132H)  hypermetylace <i>pMGMT</i> (60%)</p> <p>add(11)(q13.4qter)</p>
3A	Gemistocytární astrocytom	2	<p>del(7)(p11.2p11.2), add(7)(p22p14.1), cnLOH(12)(q24.11q24.13)</p> <p>del(3)(p11.1pter)(q28qter), del(12)(q12q22)(q23.1q23.2), del(19)(q13.2qter)  mutace <i>IDH1</i> (R132H)  hraniční hypermetylace <i>pMGMT</i> (9%)</p>
3B	Difúzní astrocytom	2	<p>del(3)(p11.1p26.3)(qa28q29), del(12)(q11.1q22)(q23.1q23.1)(q24.11q24.13), del(19)(q13.31q13.43)  mutace <i>IDH1</i> (R132H)  hypermetylace <i>pMGMT</i> (51%)</p> <p>+7, add(9)(q34.11q34.3), +10, del(13)(q14.2q14.3)(q21.2q21.3)(q21.32q21.33), cnLOH(7)(pterp13)</p>
3C	Anaplastický astrocytom	3	<p>del(3)(pterp11.1)(q28q29), +7, add(9)(q34.11q34.3), del(12)(q12q22)(q23.1q23.2)(q24.11q24.13),  del(13)(q14.3q14.3)(q21.31q21.31)(q21.33q21.33), del(19)(q13.2qter), cnLOH(7)(pterp13)  mutace <i>IDH1</i> (R132H)  hypermetylace <i>pMGMT</i> (51%)</p> <p>del(8)(q11.1q22.3), add(10)(pterp15.3), del(10)(q23.1q23.1), add(13)(q21.2q21.31)(q21.33qter), add(19)(pterp13.3)</p>

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
3D	Sekundární glioblastom	4	<p>del(3)(pterp11.1)(q13.31q13.31)(q28qter), add(9)(q34.11q34.3), add(10)(pterp15.3), add(13)(q21.33qter), del(8)(q13.3q21.13), del(12)(q11q22)(q23.1q23.2)(q24.11q24.13), del(13)(q13.1q21.2)(q21.31q21.33), del(19)(q13.2qter), cnLOH(7)(pterp13)</p> <p>mutace <i>IDH1</i> (R132H)</p> <p>hypermetylace <i>pMGMT</i> (72%)</p> <p>del(1)(q44qter), del(4)(p16.1p15.33), add(6)(p22.3p22.3), del(9)(pterp21.1), del(11)(pterp11.2)(q14.1q14.1), del(20)(q13.33qter), del(22)(q13.1qter)</p>
4A	Anaplastický astrocytom	3	<p>del(1)(p36), del(5)(p15.33pter)(q23.3q31.2)(q33.3qter), +7, del(10)(q24.33q25.1), del(19)(q13)</p> <p>del(4)(q28.3q31.21)(q35.2q35.2), del(6)(q23.2qter), del(7)(p22.1pter), del(9)(p12pter), del(11)(p11.12p11.2), del(18)(q23qter), add(19)(p13.3pter), cnLOH(17)(p11.2pter)</p> <p>mutace <i>IDH1</i> (R132H)</p> <p>bialeická delecce <i>CDKN2A/B</i></p> <p>hypermetylace <i>pMGMT</i> (20%)</p>
4B	Anaplastický astrocytom	3	<p>del(4)(q28.3qter), del(6)(q23.2qter), del(7)(pterp22.1), del(9)(pterp12), del(11)(p11.2p11.12), del(18)(q23q23), add(19)(pterp13.3), cnLOH(17)(pterp11.2)</p> <p>mutace <i>IDH1</i> (R132H)</p> <p>delecce <i>CDKN2A/B</i></p> <p>hypermetylace <i>pMGMT</i> (25%)</p> <p>del(6)(pterp21.33)(q23.1q23.2), add(7)(q22.1qter), del(13)(q14.2q14.3)(q14.3q21.1)(q21.1q21.2)(q21.32q21.32)(q21.32q21.33), del(14)(q32.2q32.12)</p> <p>hypermetylace <i>pMLH3</i> (59%)</p>



ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
6A	Anaplastický astrocytom	3	<p><b>del(1)(p36.32p36.31)(p36.23p36.22), del(13)(q14.2qter), del(16)(p13.2p12.1)(p12.1p11.2)(p11.2p11.2), del(21)(q11.2q21.2) amplifikace EGFR</b></p> <p>+7, del(9)(pterp13.1), -10, +19, add(20)(pterp13)(q11.1qter), add(X)(pterp22.33), +Y  delece CDKN2A/B  hypermetylace pMGMT (59%)</p>
6B	Glioblastom, IDH - wt	4	<p>+7, del(9)(p24.3p21.2), -10, +19, add(20)(pterp13)(q11.21qter), add(X)(pterp22.33), +Y  delece CDKN2A/B  hypermetylace pMGMT (58%)</p> <p><b>del(9)(q21.13q21.13)</b></p>
7A	Difúzní astrocytom	2	<p><b>del(2)(q36.3q37.2)(q37.3qter), add(3)(pterp22.1)(p12.1p12.1), del(3)(p22.1p12.1), del(4)(q26qter), +7, add(10)(pterp11.21), del(11)(q25qter), add(12)(pterp11.22), add(16)(q12.1q12.1), del(16)(q12.1qter)</b></p> <p>cnLOH(11)(pterp11.1), cnLOH (17)(pterp11.2), cnLOH(19)(q13.2qter)  hypermetylace pMGMT (26%)</p>
7B	Anaplastický oligoastrocytom	3	<p>cnLOH(11)(pterp11.12), cnLOH(17)(pterp11.2), cnLOH(19)(q13.2qter)  hypermetylace pMGMT (25%)</p> <p><b>cnLOH(3)(pterp11.1), cnLOH(7), cnLOH(12)(pterp11.22), cnLOH(16)(q11.2qter)</b></p>

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
8A	Difúzní astrocytom	2	<p>add(7)(q22.1qter), del(10)(p12.1p11.23), add(21)(q11.2q21.3)(q22.2q22.3), del(21)(q22.11q22.11), cnLOH(17)(pterp13.1)  hypermetylace <i>pMLH3</i> (31%)</p> <p>mutace <i>IDH1</i> (R13H)  hypermetylace <i>pMGMT</i> (45%)</p>
8B	Anaplastický astrocytom	3	<p>mutace <i>IDH1</i> (R13H)  hypermetylace <i>pMGMT</i> (40,2%)</p> <p>add(1)(p36.33p12), del(3)(p22.2p22.1)(p21.31p14.3), add(5)(p15.33p13.3), del(5)(p15.33)(q15q35.3), add(6)(p25.3p21.2), del(8)(q22.1), add(9)(q21.11q34.3), add(10)(p15.3p11.1), del(10)(q11.21q26.3), del(11)(p15.5p11.12), add(12)(q13.3q14.1), del(15)(q14q26.3), del(17)(p13.3p11.2)</p>
9A	Difúzní astrocytom	2	<p>del(2)(q36.3qter), del(4)(q13.2q13.2)(q13.3q13.3)(q13.3q21.1), add(11)(q25qter), del(11)(pterp15.2), del(12)(q12q14.1), cnLOH(12)(q14.1q14.2), cnLOH(17)(pterp11.2)</p> <p>add(7)(q21.11qter)  mutace <i>IDH1</i> (R132H)  hypermetylace <i>pMGMT</i> (23%)</p>
9B	Difúzní astrocytom	2	<p>add(7)(q21.11q36.3)  mutace <i>IDH1</i> (R132H)  hypermetylace <i>pMGMT</i> (23%)</p> <p>add(2)(p25.1p24.1), add(12)(p13.33p11.1), add(Y)(p11.32q11.31)</p>

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
10A	Difúzní astrocytom	2	<p><b>+7, +10, del(12)(q12qter)</b>  <b>hypermetylace pMLH3 (44%)</b></p> <p><b>del(X)(q23qter), cnLOH(17)(pterp11.2)</b>  <b>mutace IDH1 (R13H)</b>  <b>hypermetylace pMGMT (40%)</b></p>
10B	Difúzní astrocytom	2	<p><b>cnLOH(17)(pterp11.2)</b>  <b>mutace IDH1 (R132H)</b>  <b>hypermetylace pMGMT (20,2%)</b></p> <p><b>cnLOH(12)(q11qter), cnLOH(X)(q22.3qter)</b></p>
10C	Anaplastický astrocytom	3	<p><b>del(X)(q23q28), cnLOH(17)(p13.3p11.2)</b>  <b>mutace IDH1 (R132H)</b>  <b>hypermetylace pMGMT (40,7%)</b></p> <p><b>del(2)(p25.3p25.2), del(5)(q23.1q31.3), +7, add(8)(q22.1q24.3), del(9)(p24.3p21.1), add(9)(p21.1), add(10)(p15.2p15.1)(p14p11.21), del(10)(q25.2q26.3), del(11)(p15.5.p15.4)(q14.1q23.2), add(12)(p13.32p13.31), -13, -14, -16, del(17)(q25.1q25.3), del(19)(q13.12q13.43), del(21)(q22.3), del(22)(q11.23q13.33), del(X)(p22.33p11.22)</b>  <b>bialelická delece CDKN2A/B</b></p>
14A	Difúzní astrocytom	2	<p><b>del(2)(q36.3), del(5)(q21.3)(q32), del(6)(q26)(q27), +7 (amplifikace EGFR), -10, del(12)(q24.33), del(15)(q15.1q21.1), +19, +20,</b>  <b>cnLOH(12), cnLOH(17)</b>  <b>amplifikace EGFR</b>  hraniční <b>hypermetylace pMGMT (9%)</b></p>

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
14B	Glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4	<p>del(2)(q36.3), del(5)(q21.3)(q32), del(6)(q26)(q27), +7 (amplifikace <i>EGFR</i>), -10, del(12)(q24.33), del(15)(q15.1q21.1), +19, +20, cnLOH(12), cnLOH(17)  amplifikace <i>EGFR</i>  hypermetylace <i>pMGMT</i> (19,7%)</p> <p><b>add(1)(p36.21)</b></p>
19A	Anaplastický astrocytom	3	<p>cnLOH(7)(pterp12.1)(p11.2qter)</p> <p>add(1)(q32.1), add(7)(p12.1p11.2), del(9)(p23p21.1), -10, add(12)(pterp11.22), +19  amplifikace <i>EGFR</i>  bialelická delece <i>CDKN2A/B</i>  hypermetylace <i>pMGMT</i> (58%)</p>
19B	Anaplastický astrocytom	3	<p>add(1)(q32.1), add(7)(p11.2)(amplifikace <i>EGFR</i>), del(9)(p23p21.1)(bialel.del <i>CDKN2A</i>), -10, add(12)(p13.33p11.22), +19  amplifikace <i>EGFR</i>  bialelická delece <i>CDKN2A/B</i>  hypermetylace <i>pMGMT</i> (23,3%)</p> <p><b>add(3)(q26.33q27.1)</b>  (SNP nehodnotitelné)</p>
19C	Glioblastom, <i>IDH</i> -wt	4	<p>add(1)(q32.1), add(7)(p11.2), -10, +19  amplifikace <i>EGFR</i>  hypermetylace <i>pMGMT</i> (12,6%)  (SNP nehodnotitelné)</p>

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
20A	Difúzní astrocytom	2	<p><b>del(9)(p21.3)</b></p> <p>hypermetylace <i>pMGMT</i> (10,5%)</p>
20B	Difúzní astrocytom	2	<p>hraniční hypermetylace <i>pMGMT</i> (5%)</p>
24A	Difúzní astrocytom	2	<p><b>add(5)(q22.3q23.1)(q35.2q35.3), del(15)(q13.1q26.3), cnLOH(17)(13.3p11.2)</b></p> <p>+1, del(4)(q34.1q35.2), add(5)(p15.33p11), del(5)(q12.1q21.2)(q23.1q31.3)(q32q35.2), add(9)(33.2q34.3), del(9)(q21.11q33.2), del(10)(q21.3q22.2)(q22.3q26.3), del(11)(p15.5p15.2)(p15.1p11.12), del(12)(p13.33p12.3)(q12)(q13.12q13.3)(q14.2)(q14.3q24.33), add(18)(q22.1q23), -21, del(X)(p22.33p11.22)</p> <p>mutace <i>IDH1</i> (R132H)</p> <p>hypermetylace <i>pMGMT</i> (44,3%)</p>
24B	Anaplastický astrocytom	3	<p>+1, del(4)(q28.3q35.2), add(5)(p15.33p11), del(5)(q12.3q15)(q23.1q31.3)(q32q35.2), add(9)(q33.2q34.3), del(9)(q12q33.2), del(10)(q21.3q26.3), del(11)(p15.5p15.2)(15.1p11.12), del(12)(p13.33p13.1)(q12)(q13.12q13.3)(q14.3q24.33)(q24.23q24.31), add(18)(q22.1q23), -21, del(X)(p22.33p11.21)</p> <p>mutace <i>IDH1</i> (R132H)</p> <p>hypermetylace <i>pMGMT</i> (34,8%)</p> <p><b>del(1)(p36), -2, del(11)(q11q25), -13, -14, -15, -19, del(X)(q23q28)</b></p> <p>SNP nehodnotitelné</p>

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
25A	Difúzní astrocytom	2	<p><b>del(1)(p36), add(1)(q21.1q24.2), add(8)(q11.21qter), del(11)(pterp14.3), del(22)(q13.31q13.32)</b>  <b>hypermetylace pMLH3 (44%)</b></p> <p><b>del(1)(p21.1p11.2)(q24.2qter), del(16)(p12.2p12.1), cnLOH(17)(pterp11.2)</b>  <b>mutace IDH1 (R132H)</b>  <b>hypermetylace pMGMT (37%)</b></p>
25B	Sekundární glioblastom, IDH-mutovaný	4	<p><b>del(1)(p21.1p11.2)(q24.2q44), del(16)(p12.2p11.2), cnLOH(17)(p13.3p11.2)</b>  <b>mutace IDH1 (R132H)</b>  <b>hypermetylace pMGMT (19%)</b></p> <p><b>add(2)(pp12p11.2)(q11.1q14.3), add(3)(p26.3p25.3), del(3)(qq11.2q29), add(4)(p15.31p14)(p13p12)(q12)(q13.1q13.2)(q28.1q31.1), del(4)(q31.3)(q32.1)(q32.2q35.2), add(5)(p15.33p13.3), del(5)(q11.2q13.3)(q14.3q35.3), add(6)(q11.1q27), add(8)(p23.3p23.1), del(10)(p14p11.1)(q11.21q21.1)(q21.3q23.2)(q23.31q26.3), del(11)(p15.5q15.1), add(11)(p14.3p13)(p13p12), add(12)(p12.3p12.1)(q12)(q13.3q14.1)(q21.1q21.32), del(12)(q12q13.3)(q14.2q21.1), del(13)(q12.11q14.3)(q21.33q31.1)(q32.1q32.3), del(15)(q13.1q23)(q24.1q24.2), add(15)(q26.2q26.3), del(16)(q11.2q24.3), +18, -19, del(20)(p13)(q11.21q12), add(21)(q11.1q21.2), -22, del(X)(p22.33p21.2), cnLOH(3)(q21.2q29), cnLOH(4)(q13.1q28.1), cnLOH(5)(q13.2q14.3), cnLOH(12)(q12q14.1), cnLOH(15)(q11.2q12), cnLOH(16)(q22.3q24.3)</b></p>
26A	Difúzní astrocytom	2	<p><b>del(5)(q32q35.1), del(6)(q25.3q24.3), add(7)(q21.12q36.3), del(8)(p23.3p21.3), add(8)(p21.3p11.22), del(9)(p24.13.3), add(10)(p15.3p12.1), del(10)(q26.2q26.3), cth(13), del(14)(q22.1q31.3)(q32.11q32.2), cx(18), add(19)(p13.3), del(20)(p1p11.22), del(X)(p22.2p11.21)(q12q28), cnLOH(17)(p13.3p13.1)</b>  <b>mutace IDH1 (R132H)</b>  <b>hypermetylace pMGMT (23,2%)</b>  <b>bialelická delece CDKN2A/B</b></p>

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
26B	Anaplastický astrocytom	3	<p>del(5)(q32q35.1), del(6)(p25.3p24.3), add(7)(q21.12q36.3), del(8)(p23.3p21.3), add(8)(p21.3p11.22), del(9)(p24.3p21.1)(p13.3)(q31.1q33.3), bial.el.del(9)(p21.3), add(10)(p15.3p12.1), del(10)(q26.2q26.3), cth(13), del(14)(q22.1q31.3)(q32.11q32.13), cx(18), add(19)(p13.3), del(20)(p13p11.22), del(X)(p22.2p11.21)(q12q28), cnLOH(17)(p13.3p13.1)</p> <p>mutace <i>IDH1</i> (R132H)  hypermetylace <i>pMGMT</i> (13,3%)</p> <p>add(9)(q33.3q34.11)(q34.3), del(11)(q12.1)(q14.2q21)(q22.)(q25)</p>

**Tabulka P1: Přehled patologických nálezů u nemocných s astrocytomy.** (*IDH*-wt = *IDH* nemutovaný)

**Černé písmo** - aberace detekované pouze v diagnostickém vzorku.

**Modré písmo** - aberace detekované v diagnostickém vzorku i při opakovaných odběrech.

**Červené písmo** - aberace nové detekované při opakovaných odběrech.

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
5A	Anaplastický oligodendrogliom	3	<p>cnLOH(9)(pterp13.1), cnLOH(10), cnLOH(14), cnLOH(15), cnLOH(16)(q12.1q21), cnLOH(18)(pterp11.21)</p> <p>del(1)(p36.32p36.32), add(4)(q12q13.1), del(19)(q13.31q13.33)</p>
5B	Glioblastom, IDH-wt	4	<p>del(1)(36.32p36.13), add(4)(q12q13.2, del(19)(q13.2q13.33)</p> <p>del(9)(pterp13.2), +7, -10, del(13)(q12.3q32.1), -14, -15, del(16)(q12.1q21), del(18)(pterp11.21), hypermetylace pMGMT (12%)</p>
13A	Oligoastrocytom	2	<p>hypermetylace pMLH3 (43%)</p> <p>del(1)(pterp11.2), del(19)(q11qter)</p> <p>cnLOH(9)(pterp11.2)</p> <p>mutace IDH1 (R132H)</p> <p>hypermetylace pMGMT (34%)</p>
13B	Anaplastický oligodendrogliom	3	<p>del(1)(p36.33p11.2) del(19)(q11q13.43)</p> <p>cnLOH(9)(p24.3p13.1)</p> <p>mutace IDH1 (R132H)</p> <p>hypermetylace pMGMT (39,3%)</p> <p>del(1)(q42.3q44), del(3)(26.3p24.3), del(4)(q32.q35.2), del(8)(q24.23q24.3), -15, del(17)(p13.1p12), del(18)(p11.332p11.21)(q11.1q23), cnLOH(4)(q13.1q13.2), cnLOH(5)(q12.13.1)</p>



ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
18A	Oligodendrogliom	2	<p><b>del(1)(p36.32p11.2), del(15)(q13.1q26.3), del(19)(q11q13.43)</b>  <b>mutace <i>IDH1</i> (R132H)</b>  <b>hypermetylace <i>pMGMT</i> (37,3%)</b></p>
18B	Oligodendrogliom	2	<p><b>del(1)(p36.33p11.2), del(15)(q11.2q26.3), del(19)(q11q13.43)</b>  <b>mutace <i>IDH1</i> (R132H)</b>  <b>hypermetylace <i>pMGMT</i> (40,3%)</b></p>
23A	Oligodendrogliom	2	<p><b>del(1)(pterp11.2), del(19)(q11qter)</b>  <b>mutace <i>IDH1</i> (R132H)</b>  <b>hypermetylace <i>pMGMT</i> (29%)</b></p>
23B	Anaplastický oligodendrogliom	3	<p><b>del(1)(p36.33p11.2), del(19)(q11q13.43)</b>  <b>mutace <i>IDH1</i> (R132H)</b>  <b>hypermetylace <i>pMGMT</i> (64%)</b></p> <p><b>add(3)(q26.1), add(5)(q14.3), add(6)(q16.3), add(8)(q22.1q24.3), +11, add(13)(q21.1)(q21.31q21.32)(q31.1q31.3), add(16)(p13.3)</b></p>

**Tabulka P2: Přehled patologických nálezů u nemocných s oligodendrogliomy. (*IDH*-wt = *IDH* nemutovaný)**

**Černé písmo** - aberace detekované pouze v diagnostickém vzorku.

**Modré písmo** - aberace detekované v diagnostickém vzorku i při opakovaných odběrech.

**Červené písmo** - aberace nové detekované při opakovaných odběrech.

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
11A	Primární glioblastom	4	del(1)(q21.2q21.2), add(1)(p21.1p21.1)(q23.3q24.1)(q25.2q25.2)(q31.1q32.1)(q32.1q32.3)(q43q44) cth(1)(pterp12), del(1)(q32.3q43), +7, del(9)(p22.3p22.1)(p22.1p21.3), -10, del(11)(q13q22.3), cth(17)(q11.2q21.33), +19, +20
11B	Primární glioblastom	4	cth(1)(pterp11.1), del(1)(q32.2q43), +7, del(9)(p23.3p21.3), -10, del(11)(q13q22.3), cth(17)(q11.2q21.32), +19, +20 del(6)(p21.33p21.1), del(8)(pterp12), add(18)(pterp11.32), -22
12A	Primární glioblastom	4	+19 +7, -10 hypermetylace pMGMT (13%)
12B	Difúzní astrocytom	2	+7, -10 hypermetylace pMGMT (10,3%)
15A	Primární glioblastom	4	del(3)(p21.31) del(1)(p36.32)(q31.1q31.2)(q44)(q44), del(3)(p26.3p26.1)(q24q25.2), del(4)(q31.22q31.3), del(5)(q33.2q35.1), -6, add(7)(p11.2p11.2), del(9)(pterp21.3)(bialel.del.CDKN2A/B), -10 (bialel.del.PTEN), del(11)(p15.4)(p15.4)(p14.1), del(12)(p13.31p12.1), -13, -14, del(15)(q11.2q12)(q12)(q14), del(22)(q11.1q11.21)(q11.22q11.23)(q12.2qter)
15B	Primární glioblastom	4	del(1)(p36.32)(q31.1q31.2)(q44)(q44), del(3)(p26.3p26.1)(q24q25.2), del(4)(q31.22q31.3), del(5)(q33.2q35.1), -6, add(7)(p11.2), del(9)(pterp21.1), -10, del(11)(p15.4)(p15.4)(p14.1), del(12)(p13.31p13.1)(p13.1p12.1), -13, -14, del(15)(q11.2q12)(q12)(q14), del(22)(q11.1q11.21)(q11.22q11.23)(q12.2qter) del(9)(q31.1q34.11), add(11)(p15.4), add(15)(q25.1)

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
16A	Primární glioblastom	4	<p>add(1)(p32.1p31.3)(q21.3q22), add(3)(p21.31), add(4)(p16.3), add(5)(q31.2q31.3), +20</p> <p>del(1)(p36.32), del(3)(q26.1), add(5)(q35.2), del(6)(p25.3), add(7)(pterq21.11)(q22qter), add(8)(q22.3q22.3), del(8)(q23.3q24.13), del(9)(p23p21.2)(q34.13), add(9)(q22.2)(q31.1), -10(bialel.del.PTEN), add(11)(p15.4)(p15.2p15.1)(p13), del(11)(q14.3q23.1)(q24.3), add(12)(p13.33p13.32)(q24.11q24.12), add(15)(q22.2)(q22.31), del(16)(q22.2qter), add(17)(q25.1), +19, del(22)(q12.2q12.3)</p>
16B	Primární glioblastom	4	<p>del(1)(p36.32p36.22), del(3)(q26.1), add(5)(q35.2), del(6)(p25.3), add(7)(pterq21.11)(q21.3qter), add(8)(q22.3), del(8)(q23.3q24.13), del(9)(p23p21.2)(q34.13), add(9)(q22.2)(q31.1), -10, add(11)(p15.4)(p15.2)(p13), del(11)(q14.3q23.1)(q24.3), add(12)(p13.33p13.32)(q24.11q24.12), add(15)(q22.2)(q22.31), del(16)(q22.1qter), add(17)(q24.3)(q25.1), +19, del(22)(q11.1)(q12.3)</p> <p>add(1)(p36.22p34.2)(q21.1q44), cnLOH(1)(p34.2p13.3), add(2)(p11.2)(q14.2), add(3)(p21.31)(q26.1qter), add(6)(q16.1), add(12)(p11.21)(q13.12), add(20)(pterq11.22), add(22)(q13.1)(q13.2)</p>
17A	Primární glioblastom	4	<p>add(11)(p15.3p15.3)(p15.2p15.2), add(16)(p13.3p13.3), +19</p> <p>+7, del(9)(p22.2p21.1)(p13.3p13.1)(bialel.del.CDKN2A/B), -10, add(15)(q24.1q24.1), del(15)(q13.2q14)</p>
17B	Primární glioblastom	4	<p>+7, del(9)(p22.3p21.1)(p13.3p13.1)(bialel.del.CDKN2A/B), -10, del(15)(q13.2q14), add(15)(q24.1)</p> <p>add(3)(p26.2p24.3)(p12.3p11.1), add(4)(p16.1)(q12q13.2)(q26)(q28.3)(q32.1q32.2), del(5)(p15.1p13.3), add(6)(q12)(q15q16.3), add(8)(q23.2q23.3), add(9)(q34.11q34.3), add(12)(q23.3q24.23), del(12)(q24.32q24.33), del(15)(q11.2q12), add(18)(q22.1q22.3), add(19)(p13.3p11)(q11q13.12), del(19)(q13.42q13.43), del(X)(p21.3p11.3), hypermetylace pMGMT (35.3%)</p>

ID	Subtyp	Grade	Patologické nálezy
21A	Primární glioblastom	4	+2, +3, del(4)(pterq12)(q12qter), -5, -6, +7, cnLOH(8), add(9)(pterp13.1), cnLOH(10)(pterq11.22), del(10)(q11.22qter), -11, cnLOH(12)(pterp13.33)(p13.33q13.3)(q14.1q24.33), del(12)(p13.33), cth(12)(q13.3q14.1), -13, -14, -15, +16, del(17)(p13.1), cnLOH(18), cnLOH(19), +20, +21, add(22)(q11.1q12.1), cnLOH(22)(q12.1qter), add(X)(pterp22.33)(q28), del(Y)(p11.2)(p11.2q11.21)(q11.221)(q11.221)(q11.221)(q11.221),  add(4)(q12), hypermetylace pMGMT (64,5%)
21B	Primární glioblastom	4	add(4)(q11q12), +7, hypermetylace pMGMT (27%)  +9, add(10)(p15.3q11.21), add(12)(q13.3q14.1), +X
22A	Primární glioblastom	4	add(1)(p31.1)(q43q44), add(3)(p26.3p11.1)(q11.1q29), del(3)(p21.31), add(17)(q21.31q25.3)  del(4)(q35.1q35.2), del(6)(q25.2q25.3), +7, del(10)(q23.2q26.3)/-10, add(12)(q13.3q14.1), -14, add(17)(p13.1)
22B	Primární glioblastom	4	del(4)(q35.1), del(6)(q25.2q25.3), +7, del(10)(q23.2q26.3)/-10, add(12)(q13.3q14.1), -14, add(17)(p13.1)

**Tabulka P3: Přehled patologických nálezů u nemocných s primárními glioblastomy.**

**Černé písmo** - aberace detekované pouze v diagnostickém vzorku.

**Modré písmo** - aberace detekované v diagnostickém vzorku i při opakovaných odběrech.

**Červené písmo** - aberace nové detekované při opakovaných odběrech.