

Současné standardy molekulárně-patologického testování nádorů centrálního nervového systému

doc. RNDr. Markéta Kalinová, Ph.D.^{1,2}, Mgr. Tereza Valterová^{1,2}, prof. MUDr. Radoslav Matěj, Ph.D.^{1,3,4}

¹Ústav patologie 3. LF UK a FNKV, Praha

²Centrální laboratoře FNKV, Laboratoř genomické medicíny, Praha

³Ústav patologie a molekulární medicíny 3. LF UK a FTN, Praha

⁴Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha

Standardy molekulárně-patologického testování se s pátým vydáním WHO klasifikace nádorů centrálního nervového systému razantně mění. Významnou změnou je zapojení molekulárně genetického testování a využívání komplexního přístupu v diagnostice. Některé typy nádorů pro své správné zařazení vyžadují vyšetření molekulárního profilu. Nejčastěji jde o vyšetření jednonukleotidových mutací, delecí a kodelecí, fúzí, případně metylací. Molekulární metody rozšiřují diagnostické spektrum založené na histopatologickém a imunohistochemickém zhodnocení. Využívají se molekulární metody, jako je PCR, Sangerovo sekvenování, I-FISH, MLPA a/nebo NGS. Zcela zásadní je pro diagnostiku úzká spolupráce vyšetřujícího neuropatologa, molekulárního genetika a neuroonkologa, bez níž může dojít nesprávně užitými postupy k významnému poškození pacienta.

Klíčová slova: nádory CNS, WHO klasifikace, molekulární patologie.

Current standards for molecular pathological testing of central nervous system tumours

The standards of molecular-pathological testing are transforming with the fifth edition of the WHO classification of central nervous system tumors. A significant change involves incorporating molecular genetic testing and adopting a comprehensive diagnostic approach. Certain tumors require examining the molecular profile for accurate classification, typically analyzing single nucleotide variants, deletions, codeletions, fusions, or methylation. Molecular methods extend the diagnostic spectrum beyond histopathological and immunohistochemical assessments, using techniques like PCR, Sanger sequencing, I-FISH, MLPA, and/or NGS. Collaboration among neuropathologists, molecular geneticists, and neurooncologists is crucial for accurate diagnosis and preventing potential harm to patients.

Key words: CNS Tumors, WHO classification, molecular pathology.

Současné standardy molekulárně-patologického testování nádorů centrálního nervového systému (CNS) se opírají o nejnovější páté vydání WHO klasifikace nádorů CNS (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2021). Významnou změnou oproti předchozímu vydání je zapojení molekulárního profilování nádorů. V současné době standardní vyšetření vzorku zahrnuje základní diagnostické

přístupy založené na mikromorfologii, imunohistochemii a nově integruje metody molekulární využívající analýzu nukleových kyselin přímo do diferenciálně diagnostického procesu. Molekulární změny mají nejen diagnostický, ale i prognostický a prediktivní význam pro následnou cílenou terapii (Louis et al., 2021).

Pro komplexní diagnostiku nádorů CNS je zapotřebí v první řadě histopatologické

DECLARATIONS:

Declaration of originality:

The manuscript is original and has not been published or submitted elsewhere.

Ethical principles compliance:

The authors attest that their study was approved by the local Ethical Committee and is in compliance with human studies and animal welfare regulations of the authors' institutions as well as with the World Medical Association Declaration of Helsinki on Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects adopted by the 18th WMA General Assembly in Helsinki, Finland, in June 1964, with subsequent amendments, as well as with the ICMJE Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals, updated in December 2018, including patient consent where appropriate.

Conflict of interest:

Not applicable.

Consent for publication:

Not applicable.

Cit. zkr: *Neurol. praxi.* 2024;25(4):282-286

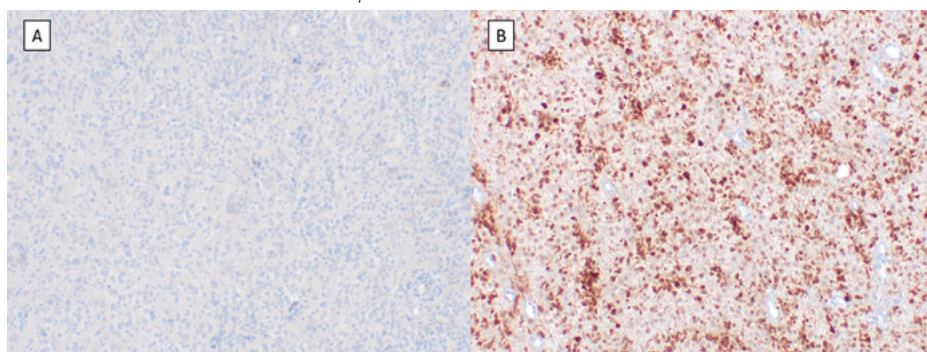
<https://doi.org/10.36290/neu.2024.016>

Článek přijat redakcí: 9. 1. 2024

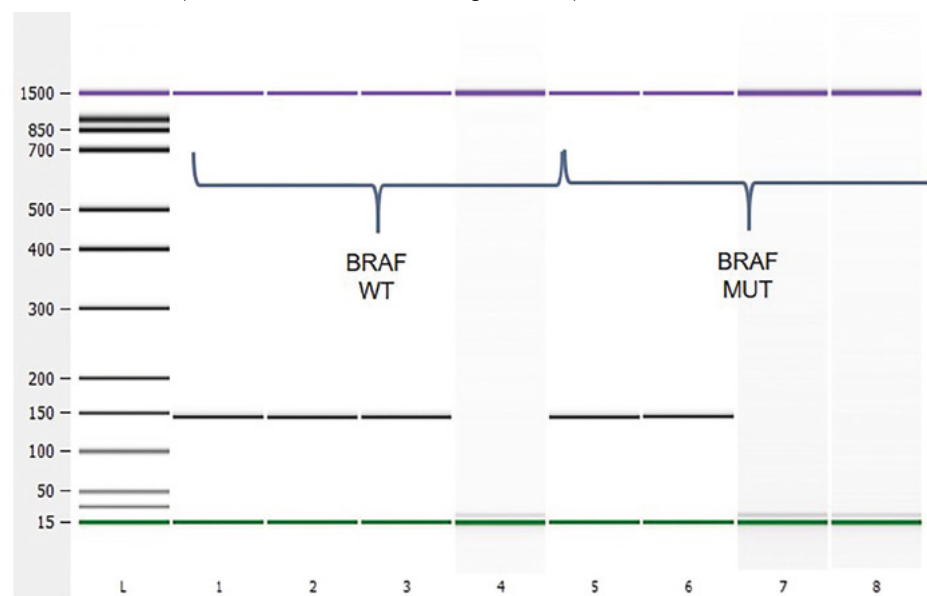
Článek přijat k publikaci: 4. 3. 2024

doc. RNDr. Markéta Kalinová, Ph.D.

marketa.kalinova@fnkv.cz

Obr. 1. Imunohistochemická detekce proteinu IDH1 R132H

Negativita (A) imunohistochemického průkazu IDH1 R132H u glioblastomu. Pozitivní (B) imunohistochemický průkaz IDH1 R132H u IDH mutovaného glioblastomu. Původní zvětšení 200x

Obr. 2. Mutačně specifické PCR, detekce mutace v genu BRAF p.V600E

Na obrázku je zobrazen výsledek mutačně specifického PCR pro detekci mutace v genu BRAF, p.V600E (NM_004333.6: c.1799T>A). PCR produkty jsou detekovány pomocí čipové elektroforézy na přístroji 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara). Pro každý vzorek probíhají dvě reakce. Vzorky 1–4 jsou amplifikovány s primery BRAF bez mutace (wild type: wt), slouží jako kontrola amplifikace a kontrola přítomnosti wtBRAF. Vzorek 1: pacient, vzorek 2: pozitivní kontrola BRAF p.V600E, vzorek 3: wt BRAF kontrola, vzorek 4: negativní kontrola (voda). Vzorky 5–8 jsou amplifikovány s mutačně specifickými primery pro mutaci p.V600E. Vzorek 5: pacient – amplifikace s mutačně specifickým primerem znamená přítomnost dané mutace, vzorek 6: pozitivní kontrola mutační, vzorek 7: kontrola wt, vzorek 8: negativní kontrola (voda)

zhodnocení tkáně s imunohistochemickým průkazem molekul ozřejmující histogenezi (např. GFAP jako marker astrocytární diferenciace). Metodu nepřímé imunohistochemie lze využít nejen k detekci dalších důležitých markerů (proliferací index měřený Ki-67, exprese proteinu p53 a podobně), ale i ke stanovení expresního statutu specifického mutovaného proteinu, např. standardizovaná protilátka k detekci mutovaného proteinu IDH1 (izocitrátdehydrogenáza 1) R132H (Anti-Human IDH1 R132H Myší monoklonální protilátka klon H09 (Obr. 1). Výhodou imunohistochemického průkazu je rychlost vyšetření, lokalizace proteinu a cenová/přístrojová nenáročnost. Na základě indi-

kace patologa/onkologa probíhá následně molekulárně-patologické vyšetření, které se liší dle změny, kterou je zapotřebí prokázat, a detekčním limitem jednotlivých metod. Lze využít molekulární vyšetření na úrovni DNA, RNA, případně metylace DNA.

Strategie molekulárního testování:

- analýza genů *IDH*: *IDH1/IDH2* (geny pro izocitrátdehydrogenázu),
- u IDH mutovaných gliomů analýza kódelece 1p/19q,
- u IDH mutovaných bez kódelece mutační analýza v genu *ATRX*, společně s posouzením mutace v genu *TP53*,
- u IDH mutovaných astrocytomů analýza homozygotní delecí *CDKN2A/CDKN2B*,

- u glioblastomů bez mutace v *IDH* vyšetření metylace promotoru *MGMT*,
- vyšetření mutace promotoru genu *TERT* (oligodendrogliomy a glioblastomy bez mutace v *IDH*),
- difúzní gliomy bez *IDH* mutace grade 2–3, vyšetření zisku chromozomu 7 a ztráty chromozomu 10 (+7/-10), amplifikace genu *EGFR* a mutace promotoru *TERT* (určení diagnózy IDHWT GBM, WHO grade 4),
- vyšetření mutace histonu *H3F3A* p. K27 u středočarových gliomů,
- testování mutace histonu *H3F3A* p. G34, genu *MYBL1*, genu *FGFR1* u dětí a mladých dospělých pacientů bez mutace v genu *IDH*,
- testování mutace v genu *BRAF* (cílená terapie),
- průkaz fúzí specifických pro daný subtyp CNS tumoru: *ZFTA:C11orf95*, *KIAA1549:BRAF* atd.

(upraveno dle: KDP [online]. Praha: ÚZIS ČR, 2020 [cit. 2023-12-21]. Dostupné z: <https://kdp.uzis.cz>). Více se strategii molekulárního testování nádorů CNS věnuje další článek tohoto čísla (Švajdlar et al., 2024).

Před každým molekulárním vyšetřením je nutné určit procentuální zastoupení nádorových buněk ve vzorku biopsie, kterou provede patolog. Úzká spolupráce mezi laboratoří (molekulárním biologem/genetikem) a vyšetřujícím patologem je stěžejní pro správnou indikaci vyšetření, výběr optimální tkáně a molekulární metodiky. Bez této úzké spolupráce může docházet ke zcela zavádějícím výsledkům (vyšetřování nenádorové tkáně či metastáz extrakraniálních nádorů v mozkové tkáni), které v konečném důsledku mohou vést k závažnému poškození pacienta. Dle 5. revize nádorů CNS je rovněž jedním z indikačních kritérií podrobnějšího molekulárně-patologického vyšetřování věk pacienta. Sice je arbitrárně stanoven věk 55 let, ale nejde jen o absolutní číslo, vždy je třeba vzít v úvahu biologický stav nemocného, jeho klinický stav a perspektivu. Z toho plyne úzká spolupráce s ošetřujícím neuroonkologem v rámci neuroonkologického multidisciplinárního týmu.

V případech detekce velkých delecí, kódelecí, amplifikací (celých genů, případně oblastí na chromozomu) využíváme fluorescenční in situ hybridizaci na interfázních jádrech (I-FISH), kdy vyšetřujeme přímo DNA v jádre

ve formolem fixované a do parafínu zalité (FFPE) tkáně. Typickým příkladem je kodelece oblastí 1p/19q, která je přítomna u oligodendrogliomů. Také je možné hodnotit změny počtu chromozomů, jako např. trizomie chromozomu 7, 10 u glioblastomů bez mutace v genu *IDH1/IDH2*.

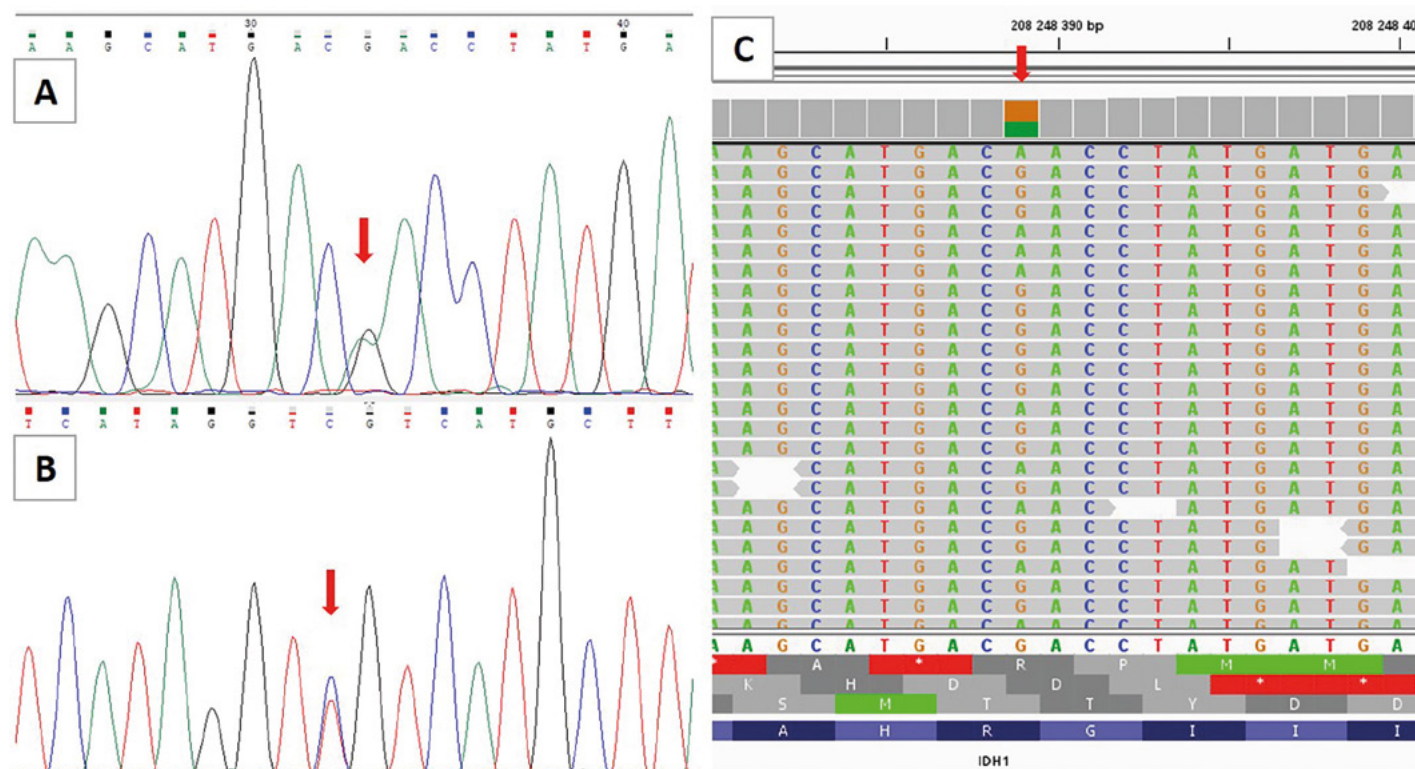
Následné metody využívají analýzu izolátu nukleových kyselin ze tkání, kdy je nutné v první řadě znát stupeň degradace izolované nukleové kyseliny z fixované tkáně a procentuální zastoupení nádorových buněk. Doporučuje se fixovat tkáň buď zmrazením, nebo fixovat v alkoholu (40 a více procentním) či pufovaném formolu. Pro detekci mutací typu jednonukleotidové záměny či malé delece nebo inserce se využívá metoda mutačně specifického PCR, případně Sangerovo (přímé) sekvenování. Mutačně specifické PCR se využívá k průkazu specifických mutací, např. mutace v genu *BRAF* (p. V600E (NM_004333.6: c.1799 T>A) s citlivostí kolem 1 % (Obr. 2). Sangerovo sekvenování je vhodné pro sekvenování jakéhokoliv genu, nicméně je nutné mít v tkáni přítomno minimálně 15–20 % nádorových

elementů. Sangerovo sekvenování u nádorů CNS využíváme k detekci mutací v genu *IDH1* a *IDH2* (IDH mutované tumory (Obr. 3)) tam, kde je *IDH1* imuhohistochemicky negativní, případně je nutné potvrzení interpretace nálezu. Mutace v promotorové oblasti genu *TERT* není tumorově specifická pro astrocytární nádory, můžeme ji detekovat u oligodendrogliomů, glioblastomů a meningiomů. V diagnostice meduloblastomů a určení jejich podtypů napomáhá vyšetření mutace v genu *CTNNB1* (WNT aktivovaný). U pediatrických pacientů se v rámci diagnostiky high-grade gliomů (HGG) specificky vyšetřují mutace v genech kódujících histony H3 (*H3F3A*), mutace p. K27, případně p. G34, vyšetřování dětských nádorů CNS je předmětem jiného článku tohoto speciálního čísla (Koblížek et al., 2024).

Metodika NGS („next generation sequencing“) je stále častěji využívána v rámci testování somatických variant nádorové tkáně. Dnešní metody umožňují testování až celých genomů, z pohledu diagnostiky nádorů je však celogenomové nebo i celoxomové sekvenování nevýhodné. Sekvenování genomů

nebo celých exomů generuje velké množství dat, z nichž velká většina není pro diagnostiku významná. Tak velké množství dat je značně náročné pro následnou analýzu, a především interpretaci nalezených variant, což prodlužuje celý proces. Proto je pro diagnostiku somatických variant dnes nejvíce využíváno cílené sekvenování panelů genů, které jsou spjaté s diagnostikou, prognózou a cílenou terapií nádorových onemocnění. Pro samotnou metodiku je důležité mít DNA v dostatečné kvalitě i kvantitě, což může být někdy problematické u FFPE vzorků. Kvalita i kvantita DNA se ověřuje hned několikrát během procesu přípravy vzorku. Pro samotnou interpretaci nalezených variant se uplatňuje několik kritérií, kdy se v potaz berou varianty jen s dostatečným počtem sekvenačního čtení, které danou variantu obsahují, a dostatečné celkové procentuální zastoupení dané varianty (nejčastěji se toto rozmezí pohybuje od 100 do 300 čtení a minimálně 3–5 % pro každou variantu). Nicméně metodika NGS umožní nejen detekci variant, ale dává i informaci o alelové frekvenci dané varianty. Metodou

Obr. 3. Sangerovo sekvenování a NGS, detekce mutace v genu *IDH1* p.R132H



Obrázky A–C zobrazují detekci mutace v genu *IDH1* (NM_005896.4):c.395G>A, p.(Arg132His). Na obrázcích A, B jsou zobrazeny sekvenogramy získané Sangerovým sekvenováním. Mutace je zobrazena červenou šipkou ve „forward“ (A) i „reverse“ (B) sekvenci. Obrázek C ukazuje danou mutaci získanou pomocí metody NGS a vizualizovanou programem IGV (Thorvaldsdóttir et al., 2013). V daném místě (znázorněném červenou šipkou) jsou zobrazena jednotlivá čtení, kde lze vidět báze odpovídající wild type (G) i mutované (A) sekvenci. Ve všech případech je sledovaná sekvence zarovnána k referenční sekvenci, která je na obrázku C zobrazena v dolní části

Tab. 1. Tabulka klíčových genů a molekulárních profilů u primárních nádorů CNS

Typ tumoru	Geny/charakteristicky alterované molekulární profily ^a
astrocytom, IDH mutovaný	IDH1, IDH2, ATRX, TP53, CDKN2A/B
oligodendrogliom, IDH mutovaný s kodelecí 1p/19q	IDH1, IDH2, 1p/19q, TERT promotor, CIC, FUBP1, NOTCH1
glioblastom, IDH wildtype	IDH-wildtype, TERT promotor, chromozomy 7/10, EGFR
difuzní astrocytom, MYB nebo MYBL1 alterovaný	MYB, MYBL1
angiocentrický gliom	MYB
polymorfní low-grade neuroepiteliální tumor mladých	BRAF, FGFR rodina
difuzní low-grade gliom, MAPK dráha alterovaný	FGFR, BRAF
difuzní středočarový gliom, H3 K27 alterovaný	H3 K27, TP53, ACVR1, PDGFRA, EGFR, EZHIP
difuzní hemisferický gliom, H3 G34 mutovaný	H3 G34, TP53, ATRX
difuzní high grade gliom pediatrického typu, H3 wildtype, IDH wildtype	IDH wildtype, H3 wildtype, PDGFRA, MYCN, EGFR, metylom
hemisferický gliom infantního typu	NTRK rodina, ALK, ROS, MET
pilocytický astrocytom	KIAA1549::BRAF, BRAF, NF1
high grade astrocytom s piloidními rysy	BRAF, NF1, ATRX, CDKN2A/B, metylom
pleomorfní xantoastrocytom	BRAF, CDKN2A/B
subependymální velkobuněčný astrocytom	TSC1, TSC2
chordoidní gliom	PRKCA
astroblastom, MN1 alterovaný	MN1
ganglionický tumor	BRAF
dysembryoplastický neuroepiteliální tumor	FGFR1
difuzní glioneurální tumor s oligoneurogliomu podobnými rysy a jadernými shluky	chromozom 14, metylom
papilární glioneurální tumor	PRKCA
glioneurální tumor s rozetami	FGFR1, PIK3CA, NF1
myxoidní glioneurální tumor	PDGFRA
difuzní leptomeningeální glioneurální tumor	KIAA1549::BRAF, 1p, metylom
multinodulární a vakuolizující neurální tumor	MAPK dráha
dysplastický cerebrální gangliocyto	PTEN
extraventrikulární neurocyto	FGFR (FGFR1::TACC1), metylom
supratentoriální ependymom	ZFTA, RELA, YAP1, MAML2
ependymom zadní jámy	H3 K27me3, EZHIP, metylom
spinální ependymom	NF2, MYCN
meduloblastom, WNT aktivovaný	CTNNB1, APC
meduloblastom, SHH aktivovaný	TP53, PTCH1, SUFU, SMO, MYCN, GLI2, metylom
meduloblastom, non WNT/non-SHH	MYC, MYCN, PRDM6, KDM6A, metylom
atypický teratoidní/rhabdoidní tumor	SMARCB1, SMARCA4
embryonální tumor s vícevrstevnými rozetami	C19MC, DICER1
CNS neuroblastom, FOXR2 aktivovaný	FOXR2
CNS tumor s BCOR interní tandemovou duplikací	BCOR
desmoplastický myxoidní tumor pineální oblasti, SMARCB1 mutovaný	SMARCB1
meningiom	NF2, AKT1, TRAF7, SMO, PIK3CA, KLF4, SMARCE1, BAP1, H3K27me3, TERT promotor, CDKN2A/B
solitární fibrózní tumor	NAB2::STAT6
meningeální melanocytický tumor	NRAS, GNAQ, GNA11, PLCB4, CYSLTR2

Některé z výše zmíněných genů a jejich změny jsou důležité přímo pro určení či zpřesnění diagnózy, zatímco jiné jsou často alterované u dané diagnózy, ale nejsou esenciální pro určení diagnózy.

^a V tomto sloupci jsou nejprve řazeny geny, které jsou důležité pro určení diagnózy. Většina typů nádorů nese specifický metylační profil, avšak „metylom“ je v tomto sloupci uvedeno pouze u typů, u kterých je jeho testování důležité při stanovení diagnózy či rozřazení do subtypů. H3 je tu označena genová rodina, do které spadají především geny H3F3A a HIST1H3B (Louis et al., 2021; upraveno).

tedy můžeme detekovat i případné subklony nádorového onemocnění. Reportují se varianty/mutace s klasifikací patogenní, pravděpodobně patogenní a varianty nejasného významu (Li et al., 2017). Na obrázku 3 jsou

vizualizovány výsledky metod Sangerova sekvencování a NGS genu *IDH1*.

Pro detekci genových fúzí je zapotřebí v prvním kroku izolovat RNA ze vzorku tkáně a ověřit její kvalitu. Následuje buď RT-

-PCR k detekci specifické fúze (např. fúze *ZFTA:C11orf95*, *YAP1:MAMLD1* specifické pro ependymomy, *KIAA1549:BRAF* pro pilocytický astrocytom a difuzní leptomeningeální glioneurální tumor), nebo se využívá metodika NGS pro identifikaci fúzí při zapojení alespoň jednoho genu ve fúzi v cíleném NGS panelu. RNA NGS se využívá k detekci fúzí v různých exonech vyšetřovaného genu, k hodnocení exon „skippingu“ a hladin exprese, např. lze využít Archer FusionPlex NGS panely (Archer/Invitae, Boulder, USA) (Archer FUSIONPlex Pan Solid Tumor v2 panel [online], cit. 21. 12. 2023).

Další metodou, která umožňuje hodnocení počtu kopií genu nebo oblasti DNA (detekce delecí, duplikací, CNV – „copy number variation“), je MLPA („multiplex ligation probe amplification“). Na rozdíl od metody I-FISH se touto metodou vyšetřuje již izolovaná DNA. Výhodou je možnost multiplexní reakce, kdy se může současně analyzovat až 60 cílů v genomu. Limitací metody pro analýzu nádorové tkáně je nutnost mít alespoň 50 % nádorových buněk ve vyšetřovaném materiálu. Pomocí metody MLPA je možné detekovat CNV (např. *PDGFRA* 4q12, *EGFR* 7p11.2, *CDKN2A* 9p21.3), ale i bodové mutace (např. *BRAF-IDH1-IDH2*) nebo metylaci pomocí metylačně specifické MLPA (MS-MLPA) (<https://www.mrcholland.com/> [online], cit. 19. 12. 2023; Schouten et al., 2002).

V rámci diagnostiky a léčebné strategie se u nádorů CNS rozvíjí metylační analýza. Přínosná může být informace o metylaci určitých lokusů (např. metylace promotoru genu *MGMT*) nebo komplexní metylace dané tkáně (tzv. metylační profil). Pro detekci metylace specifických lokusů DNA se může využívat metylačně specifická PCR (kvalitativní metoda) nebo metylačně senzitivní MLPA (MS-MLPA; semi-quantitativní metoda). Na trhu existuje např. komerčně dostupný kit MS-MLPA (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands) pro detekci metylace promotoru genu *MGMT* a bodových mutací v genech *IDH1* (p. R132H=c.395G>A a p. R132C=c.394C>T) a *IDH2* (p. R172K=c.515G>A a p. R172M=c.515G>T) v jedné reakci, což představuje zajímavé řešení pro rychlý kombinovaný screening daných prediktivních genů (<https://www.mrcholland.com/> [online], cit. 19. 12. 2023).

Pokud chceme získat metylační profil nádorové léze, pak je nutné využít komplexnějších technik, jako je DNA metylační „array“ (Illumina, San Diego, CA, USA). Jedná se o robustní komplexní technologii, kterou lze využít i pro vzorky s nižší kvalitou DNA (FFPE vzorky), což je nesporná výhoda v diagnostice CNS nádorů. Optimální zastoupení nádorových buněk pro tuto metodu je > 70 % (Capper et al., 2018; Serrano et Snuderl, 2018). K následnému zařazení nádorů CNS do typů a subtypů dle metylačního profilu se využívá klasifikátor Brain classifier verze 12.8 dostupný z <https://www.molecularneuropathology.org>. Metylační profil u nádorových onemocnění může odhalit i vzácné subtypy onemocnění a je tak dalším dílkem do mozaiky integrované diagnózy (Capper et al., 2018; <https://www.molecularneuropathology.org/> [online], cit 19. 12. 2023).

LITERATURA

1. Archer FUSIONPlex Pan Solid Tumor v2 panel <https://eu.idtdna.com/pages/products/next-generation-sequencing/archer-ngs-assay-solutions/solid-tumor-research/archer-fusionplex-pan-solid-v2-panel> [Internet] [Cit. 21. 12. 2023]. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/products/next-generation-sequencing/archer-ngs-assay-solutions/solid-tumor-research/archer-fusionplex-pan-solid-v2-panel>.
2. Capper D, Jones DTW, Sill M, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*. 2018;555(7697):469-474. <https://doi.org/10.1038/nature26000>.
3. Capper D, Stichel D, Sahm F, et al. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: The Heidelberg experience. *Acta Neuropathologica*. 2018;136(2):181-210. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1879-y>.
4. MolecularNeuropathology.org – The platform for next generation neuropathology [Internet]. [Cit. 19. 12. 2023]. Available from: <https://www.molecularneuropathology.org/>.
5. Mrcholland.com. [Internet] [Cit. 19. 12. 2023]. Available from:

Závěr

Diagnostika nádorů CNS se sice stále opírá o klasické histologické a IHC metody, avšak v posledních letech pronikají do rutinního diagnostického procesu čím dál tím více i molekulárně genetické metody. Ty nejen napomáhají především přesnější klasifikaci, ale mohou mít i prediktivní, prognostický a terapeutický význam. Klíčové geny pro molekulární profilování jednotlivých typů jsou shrnuty v tabulce 1. K diagnostice nádorů CNS je nutné přistupovat komplexně a multidisciplinárně. Jednotlivá vyšetření se vzájemně doplňují a společně tvoří tzv. integrovanou diagnózu. I přesto mohou být některé případy složitě z hlediska přesného určení jednoznačné diagnózy. V posledních letech napomáhá zpřesnění diagnózy některých nádorových

lézí a klinické stratifikaci pacientů také DNA metylační profilování. Určení typu nádoru CNS dle DNA metylačního profilu je nejpřínosnější u histologicky nejednoznačných případů, které mohou nést cílenou alteraci pro terapii. Bez úzké spolupráce patologa, neurochirurga, neuroonkologa a molekulárního biologa již není diagnostika nádorů CNS vůbec možná.

Financování

Tato studie vznikla za podpory MZ ČR – DRO: Koncepční rozvoj výzkumné organizace, Všeobecná Fakultní nemocnice Praha (VFN, 00064165); Fakultní Thomayerova nemocnice, Praha (TUH, 00064190) a Univerzity Karlovy (Projekt Cooperatio Medicínská diagnostika) a Interního grantu FNKV 2023.

<https://www.mrcholland.com/>.

6. Koblížek M, Zámečník J. Nádory CNS dětí – nový pohled. *Neurol. praxi*. 2024;25(4):263-266.
7. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*. 2017;19(1):4-23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.002>.
8. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology*. 2021;23(8):1231-1251. Available from: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.
9. Serrano J, Snuderl M. Whole Genome DNA Methylation Analysis of Human Glioblastoma Using Illumina BeadArrays. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 2018;1741:31-51. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7659-1_2.
10. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative

quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(12):e57-e57. <https://doi.org/10.1093/nar/gnf056>.

11. Smrčka M, Belanová R, Fadrus P, et al. KDP: Gliomy mozku – diagnostika a léčba [online]. Praha: ÚZIS ČR, 2020. [Cit. 21. 12. 2023]. Available from: <https://kdp.uzis.cz>.
12. Švajdler M, Švajdler P, Kolečák R, et al. Praktická diagnostika nádorů CNS podle WHO klasifikace 2021: Všeobecné změny a diagnostika difúzních gliómů. *Neurol. praxi*. 2024;25(4):256-262.
13. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*. 2013;14(2):178-192. Available from: <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>.
14. WHO Classification of Tumours Editorial Board. (2021). World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System (5. vyd.). Lyon: International Agency for Research on Cancer. 568 s. ISBN 9789283245087.