

Molekulární klasifikace meduloblastomů pomocí celogenomového expresního profilování

Molecular Classification of Medulloblastomas by Whole Genome Expression Profiling

Nosková H.^{1,2}, Adamcová S.², Knoflíčková D.², Radová L.², Pavelka Z.¹, Vejmělková K.¹, Zitterbart K.¹, Slabý O.¹⁻³, Štěrba J.^{1,4}

¹ Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

³ Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁴ Mezinárodní centrum klinického výzkumu, FN u sv. Anny v Brně

Souhrn

Východiska: Meduloblastom (MB) je nejčastější maligní nádor centrálního nervového systému u dětí. V ČR ročně onemocní tímto nádorem přibližně 10–12 dětí. MB jsou považovány za vysoce rizikové nádory se sklonem k metastazování. Současné pokroky v molekulární diagnostice pomáhají ve zpřesnění diagnózy a předpovědi klinického průběhu onemocnění. V současné době jsou MB rozdělovány do podskupin, a to na základě molekulárních drah řídicích jejich vznik, na WNT aktivované, SHH aktivované, skupinu 3 a 4. Jednotlivé podskupiny se liší svou histologií, klinickým průběhem, genomickými změnami a profily genové exprese. Cílem naší studie je klasifikace pacientů s MB do čtyř základních molekulárních skupin a porovnání získaných výsledků s literaturou. **Materiál a metody:** U pacientů s MB je v rámci naší studie prováděno profilování genových expresí pomocí Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0. ST Array (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Vstupním materiálem je celková RNA izolovaná ze zamražené nádorové tkáně. Samotná klasifikace je založena na metodě vyvinuté P. Northcottem v roce 2011. **Výsledky:** Od dubna 2015 do února 2019 bylo do naší studie zařazeno celkem 21 pacientů s MB. Medián věku pacienta v době diagnózy byl 6 let, zařazeno bylo 14 chlapců a 7 dívek. U pacientů bylo provedeno profilování genové exprese a následná molekulární klasifikace MB. Zjistili jsme, že nejčastěji zastoupená skupina MB byla skupina 4 (9 pacientů, 43 %), následovala skupina 3 (5 pacientů, 24 %), SHH aktivovaný MB (4 pacienti, 19 %) a nejméně zastoupenou skupinou byl WNT aktivovaný MB (3 pacienti, 14 %). Výsledky stanovení podskupiny MB byly úspěšně korelovány s histopatologickým nálezem a dalšími molekulárně genetickými vyšetřeními. **Závěr:** Molekulární klasifikace pacientů s MB, která byla zavedena na našem pracovišti, umožňuje lépe porozumět tomuto heterogennímu charakteru onemocnění a pomáhá v terapeutickém plánování.

Klíčová slova

expresní profilování – personalizovaná medicína – dětská onkologie – meduloblastom

Práce byla podpořena MZ ČR, grantem 16-33209A. Všechna práva vyhrazena.

This work was supported by the Czech Ministry of Health grant No. 16-33209A. All rights reserved.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
CEITEC – Středoevropský
technologický institut
Masarykova univerzita
Kamenice 753/5
625 00 Brno
e-mail: on.slaby@gmail.com

prof. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D.
Klinika dětské onkologie
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: sterba.jaroslav@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 1. 3. 2019

Přijato/Accepted: 4. 3. 2019

Summary

Background: Medulloblastoma (MB) is the most common malignant tumour of the central nervous system in children. MB is considered to be high risk tumour propensity to metastasize. In the Czech Republic, approximately 10–12 children are affected annually by this tumour. Recent progress in molecular diagnostics helps to refine the diagnosis and estimate clinical prognosis of the disease. Currently, MBs are subclassified into WNT-activated, SHH-activated, group 3, and 4 based on molecular pathways that drive their tumorigenesis. Each subtype differs in its histopathology, clinical features, genomic changes and gene expressions. The aim of our study is to classify patient's MBs into four basic molecular groups and compare our results with published data. **Material and methods:** In our study we analysed expression profiles using Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0. ST Array (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). As input material RNA extracted from the fresh frozen tissue was used. Molecular classification based on the method established by P. Northcott in 2011 was performed. **Results:** From April 2015 to February 2019, 21 patients with MBs were included in our study. Median age of the patients at the time of diagnosis was 6 years, 14 boys and 7 girls were enrolled. Gene expression profiling and molecular classification of MBs was performed. Based on this methodology, we found the most frequently represented subgroup of MB was group 4 (9 patients, 43%), followed by group 3 (5 patients, 24%), SHH-activated MB (4 patients, 19%) and the least represented subgroup was WNT-activated MB (3 patients, 14%). Results of molecular subgroup classification of MBs were successfully correlated with histopathological findings and other molecular-genetic examinations. **Conclusion:** Molecular classification of MBs has been established in our institution allowing better understanding of this heterogeneous disease and helping clinicians in therapeutic planning in affected patients.

Klíčová slova

gene expression profiling – precision medicine – pediatric oncology – medulloblastoma

Východiska

Medulloblastom (MB) je nejčastějším maligním nádorem centrálního nervového systému v dětském věku, který tvoří okolo 20 % všech pediatrických mozkových tumorů [1]. Incidence MB je odhadována na 0,7/100 000 dětí ročně, s mírnou převahou se častěji vyskytuje u chlapců (1,5 : 1) [1]. Pohlaví hraje také roli v prognóze onemocnění, medián přežití je u dívek vyšší než u chlapců [2]. Ročně v ČR onemocnění MB přibližně 10–12 dětí, medián věku při diagnóze je 9 let. U dospělých představuje MB asi 3 % primárních nádorů centrálního nervového systému a incidence s věkem klesá [3,4].

Ve snaze stratifikovat léčbu u pacientů s těmito nádory jsou v současné době MB rozdělovány do podskupin, a to na základě molekulárních drah řídicích jejich vznik, na WNT aktivované, SHH aktivované, skupinu 3 a skupinu 4 [5]. Jednotlivé podskupiny je možné identifikovat na základě profilování genových expresí metodou vyvinutou Northcottem et al v roce 2011 [6]. Jednotlivé podskupiny se liší prognózou, WNT aktivované MB jsou dobře léčitelné za použití standardních protokolů, naopak MB skupiny 3 mají velmi špatnou prognózu. MB podskupiny 4 a SHH aktivované MB jsou asociovány s prognózou střední a pacienti s MB těchto podskupin se v prognóze vyznačují širokou variabilitou. Podle současného konsenzu jsou

pacienti s MB podle rizika rozdělováni na nízké, průměrné, vysoce a velmi vysoce rizikové [7]. Důležitým aspektem této klasifikace je, že nádory stejné molekulární podskupiny mohou spadat do různých rizikových skupin, a to na základě přítomnosti nebo absence určitých molekulárních a klinických znaků [8]. Cílem tohoto rozdělení je identifikovat vysoce rizikové pacienty, u kterých je nutné hledat nové možnosti léčby, a pacienty s MB nízkého rizika, u kterých je možné bezpečně snížit dávku standardní léčby, a redukovat tak pozdní následky toxické chemoterapie. V roce 2017 byl zaveden nový způsob kategorizace MB a identifikováno bylo celkem 12 podskupin, které se vyznačují různými molekulárními a klinickými vlastnostmi [9]. Tyto podskupiny lze detekovat pouze kombinací metod profilování genových expresí a metylace DNA.

Cílem této naší studie je klasifikace pacientů s MB na základě expresního profilování do čtyř základních molekulárních podskupin a srovnání získaných výsledků s literaturou.

Materiál a metody

U pacientů s MB je v rámci naší studie prováděno profilování genových expresí pomocí Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0. ST Array (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Vstupním materiálem je celková RNA izolovaná ze zamražené nádorové tkáně za použití

mirVana miRNA Isolation kitu (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Příprava vzorků na čipy probíhá pomocí kitu GeneChip WT PLUS Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Postup zahrnuje jednotlivé kroky úprav a přepisů nukleových kyselin na koncovou formu DNA, která se v konečné fázi aplikuje do čipu a následně dochází k její hybridizaci. Po 16hod hybridizaci jsou dále čipy promývány, barveny a skenovány. Pro identifikaci podskupiny MB byl na základě genového expresního profilu dle Northcotta et al [6] vytvořen regresní model, který byl následně použit jako pravidlo pro klasifikaci u provedeného čipu pacienta. Výsledkem klasifikace je predikce kategorie MB (tzn. nejvíce pravděpodobné kategorie).

Výsledky

Od dubna 2015 do února 2019 bylo do naší studie zařazeno celkem 21 pacientů s MB. Vzorky od všech pacientů byly získány v době diagnózy. Věk pacientů v době diagnózy se pohyboval od 4 měsíců do 25 let (medián 6 let). Ve věku ≤ 3 roky bylo zařazeno 5 pacientů, ve věku > 3 do ≤ 18 let 14 pacientů a ve věku > 18 let byli 2 pacienti. Zařazeno bylo 14 chlapců a 7 dívek. U všech vzorků MB bylo úspěšně provedeno transkrip-tomové profilování pomocí Affymetrix technologie a následná klasifikace MB dle Northcotta et al [6]. Identifikace podskupin MB odhalila, že nejčastěji za-

stoupená podskupina MB byla skupina 4 (9 pacientů, 43 %), dále následovala skupina 3 (5 pacientů, 24 %), SHH aktivovaný MB (4 pacienti, 19 %) a nejméně zastoupenou podskupinou byl WNT aktivovaný MB (3 pacienti, 14 %). Výsledky stanovení podskupiny MB byly úspěšně korelovány s histopatologickým nálezem a dalšími molekulárně genetickými vyšetřeními.

Diskuze a závěr

Klinické chování MB nelze zcela předpovědět bez detailní znalosti molekulární biologie tumoru. V naší studii jsme u 21 pacientů s MB provedli profilování genových expresí a následnou klasifikaci podskupiny MB. Zjistili jsme, že nejvíce zastoupená podskupina MB mezi našimi pacienty byla skupina 4 (43 %), dále skupina 3 (24 %), skupina SHH aktivovaný MB (19 %) a nejméně pacientů bylo s WNT aktivovaným MB (14 %). Toto zjištění odpovídá studii publikované v roce 2008 Koolem et al [10], v níž u 22 z celkem 62 (35 %) pacientů byla identifikována skupina D, u 16 (26 %) pacientů skupina C, u 15 (24 %) pacientů podskupina SHH aktivovaný MB a u 9 případů (15 %) podskupina WNT aktivovaný MB. Medián věku, ve kterém byl u pacientů diagnostikován MB, v této studii odpovídal našim výsledkům (6 let). Poměr zastoupení pohlaví opět koreloval s našimi daty (1,95 : 1 vs. 2 : 1), ve srovnání s běžně udávaným poměrem 1,5 : 1. Northcott et al v roce 2010 provedli studii, která zahrnovala 294 pacientů [5]. U dětí do 3 let našli jako nejčastější podskupinu SHH aktivovaný MB (65 %). V naší studii byla u dětí v tomto věku nejčastěji zastoupena podskupina SHH společně se sku-

pinou 3 (40 %). Northcott et al dále zjistili, že u dětí mezi 4 a 15 lety převládala skupina D (44 %), výsledky u našich pacientů tomuto zjištění odpovídají (57 %). U pacientů nad 16 let věku identifikovali Northcott et al jako nejčastější podskupinu MB SHH (72 %). V našem souboru pacientů byly zařazeny dvě pacientky starší 16 let, u jedné byla potvrzena podskupina SHH (50 %), u druhé podskupina WNT. Poměr pohlaví ve studii Northcotta et al byl 1,55 : 1 (vs. 2 : 1 v naší studii). Northcott et al dále zjistili, že 70 % chlapců spadalo do podskupin 3 nebo 4, zatímco u dívek tomu tak bylo ve 42 % případů. Na druhou stranu u dívek převládala podskupina SHH (47 %), chlapců s touto podskupinou bylo přibližně 24 %. V souboru našich pacientů jednoznačně převládají chlapci, jejichž MB byl zařazen do podskupiny 3 nebo 4 (93 %). U děvčat byly nejčastěji nalezeny podskupiny WNT a SHH (86 %). Obecně platí, že MB podskupin WNT a SHH jsou spojeny s lepším klinickým průběhem ve srovnání s MB podskupiny 3 a 4. Bylo zjištěno, že pohlaví hraje rovněž roli v prognóze tohoto onemocnění, medián přežití je u dívek výrazně vyšší než u chlapců [2]. V naší studii toto mínění můžeme potvrdit, protože drtivá většina chlapců (93 %) spadala do podskupin s obecně horší prognózou.

Molekulární klasifikace pacientů s MB, která byla zavedena na našem pracovišti, umožňuje lépe porozumět tomuto heterogennímu onemocnění a pomáhá v terapeutickém plánování. Důležité je se však nadále věnovat přesnější stratifikaci rizika, a to především u pacientů s SHH aktivovaným MB a MB skupiny 4, mezi nimiž je popisována široká varia-

bilita v prognóze. Identifikace pacientů s nízkým a naopak s vysokým rizikem v rámci jedné podskupiny však vyžaduje kombinaci metod profilování genových expresí a metylace DNA. Tento přístup představuje stěžejní krok směrem k personalizované terapii, která je založena na určení míry rizika MB u každého pacienta.

Literatura

1. McKean-Cowdin R, Razavi P, Barrington-Trimis J et al. Trends in childhood brain tumor incidence, 1973–2009. *J Neurooncol* 2013; 115(2): 153–160. doi: 10.1007/s11060-013-1212-5.
2. Curran EK, Sainani KL, Le GM et al. Gender affects survival for medulloblastoma only in older children and adults: a study from the Surveillance Epidemiology and End Results Registry. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52(1): 60–64. doi: 10.1002/pbc.21832.
3. Herrlinger U, Steinbrecher A, Rieger J et al. Adult medulloblastoma: prognostic factors and response to therapy at diagnosis and at relapse. *J Neurol* 2005; 252(3): 291–299. doi: 10.1007/s00415-005-0560-2.
4. Zitterbart K, Pavelka Z, Zitterbartová J. Medulloblastom: nejčastější zhoubný nádor mozku u dětí. *Onkologie* 2010; 4(4): 256–259.
5. Northcott PA, Korshunov A, Witt H et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol* 2011; 29(11): 1408–1414. doi: 10.1200/JCO.2009.27.4324.
6. Northcott PA, Shih DJ, Remke M et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol* 2012; 123(4): 615–626. doi: 10.1007/s00401-011-0899-7.
7. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2016; 131(6): 821–831. doi: 10.1007/s00401-016-1569-6.
8. Zhukova N, Ramaswamy V, Remke M et al. Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. *J Clin Oncol* 2013; 31(23): 2927–2935. doi: 10.1200/JCO.2012.48.5052.
9. Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L et al. Intertumoral heterogeneity within medulloblastoma subgroups. *Cancer Cell* 2017; 31(6): 737–754. doi: 10.1016/j.ccell.2017.05.005.
10. Kool M, Koster J, Bunt J et al. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One* 2008; 3(8): e3088. doi: 10.1371/journal.pone.0003088.