

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



Šárka Jarošová

Současný pohled na molekulární varianty medulloblastomů  
Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Martina Zíková, CSc.

Praha, 2017

### *Poděkování*

Chtěla bych poděkovat své školitelce, Martině Zíkové, za trpělivost a pomoc při psaní mé bakalářské práce.

*Prohlášení*

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma: Současný pohled na molekulární varianty meduloblastomů jsem vypracovala sama s použitím literatury na základě konzultací se svou školitelkou.

Praha 2017

Šárka Jarošová

## Abstrakt

Meduloblastom je nejčastějším maligním nádorem centrálního nervového systému v dětském věku. Nové poznatky v charakterizaci molekulární a genetické podstaty této heterogenní nemoci umožňují lépe odhadnout prognózu pacienta a následně nastavit cílenou léčbu. Práce shrnuje současný stav poznání v této oblasti, popisuje jednotlivé molekulární varianty meduloblastomů a jim příslušející genové mutace.

## Abstract

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor in children. In recent years, there has been a steady improvement in understanding of genetic and molecular heterogeneity of this tumor, that has led to better prognosis and improved targeted therapies. This thesis summarizes recent advances in molecular sub-grouping, and the associated gene mutation and copy number variations in medulloblastoma.

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. O meduloblastomech obecně .....	1
3. Historie .....	2
4. Průběh onemocnění .....	2
5. Histologie .....	3
Klasický meduloblastom .....	4
Desmoplastický/nodulární meduloblastom .....	4
Meduloblastom s extenzivní nodularitou .....	4
Anaplastický meduloblastom .....	4
Velkobuněčný meduloblastom .....	4
6. Rozdělení do molekulárních podskupin .....	5
7. WNT .....	6
8. SHH .....	8
9. C skupina .....	10
10. D skupina .....	11
11. Genetické syndromy spojené s meduloblastomy .....	12
Gorlinův syndrom .....	12
Turcotův syndrom .....	12
Li-Fraumeniho syndrom .....	13
12. Terapie .....	14
Látky .....	16
13. Subtypy u dospělých .....	17
14. Metody výzkumu .....	17
15. Dostupné linie .....	17
16. Bioinformatická data .....	19
17. Závěr .....	21
18. Seznam citací .....	22

## 1. Úvod

Moje práce pojednává o obecné charakteristice meduloblastomů (MB), jejich rozdělení na molekulárním základě dle nejnovějších poznatků, stávající léčbě a nových zajímavých léčebných postupech. Zaměřuji se na rozdělení MB do jednotlivých podskupin, jelikož je toto rozdělení velice aktuální z hlediska léčby. Ukazuje se, že bychom s jednotlivými podskupinami nádorů měli zacházet spíše jako s různými nemocemi než s jedním druhem, neb se liší ve většině základních vlastnostech. A to v molekulární podstatě, histologii, demografickém rozdělení pacientů i nejlépe fungující léčbě.

Nomenklaturu používám podle pravidel Rules for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat a HUGO Gene Nomenclature Comminttee, což znamená, že názvy lidských genů jsou psány velkými písmeny a italkou, názvy myších genů malými písmeny a italkou a názvy lidských i myších proteinů velkými písmeny.

## 2. O meduloblastomech obecně

Mozkové nádory jsou jedním z nejčastějších druhů rakoviny u dětí, okolo 13 % mozkových nádorů tvoří MB. Jsou to neinvazivní, rychle rostoucí nádory, které často vedou ke smrti. Přestože se v poslední době významně zvýšila úspěšnost léčby díky operacím, ozařování kraniospinální osy a vysokodávkovým chemoterapiím (za posledních 20 let o 30 %), stále jsou meduloblastomy zákeřnou nemocí, u které přeživší mohou trpět neurologickými, endokrinologickými a sociálními následky.

Ročně v České republice onemocní 10 – 12 dětí (Zitterbart, et al. 2010), v USA je ročně diagnostikováno 400 – 500 MB pacientů (Gopalakrishnan, et al. 2015). Současná úspěšnost léčby dosahuje pětiletého bezpříznakového přežití v 70 – 80 % u pacientů standartního rizika a 30 – 70 % u pacientů vysokého rizika. S mírnou převahou je dominantní u chlapců a mužů (1,2-2:1) (Zitterbart, et al. 2010).

### 3. Historie

Nádor, který nyní nazýváme meduloblastomem, objevil a pojmenoval v roce 1925 americký lékař Harvey Cushing (Kunschner 2002). Mimo jiné poprvé provedl operaci MB, což radikálně zvýšilo účinnost léčby. Společně s Percivalem Baileym publikovali článek: *Medulloblastoma Cerebelli: a Common Type of Midcerebellar Glioma of Childhood*, což byl zakládající článek pro výzkum meduloblastomů (Ferguson and Lesniak 2005).

### 4. Průběh onemocnění

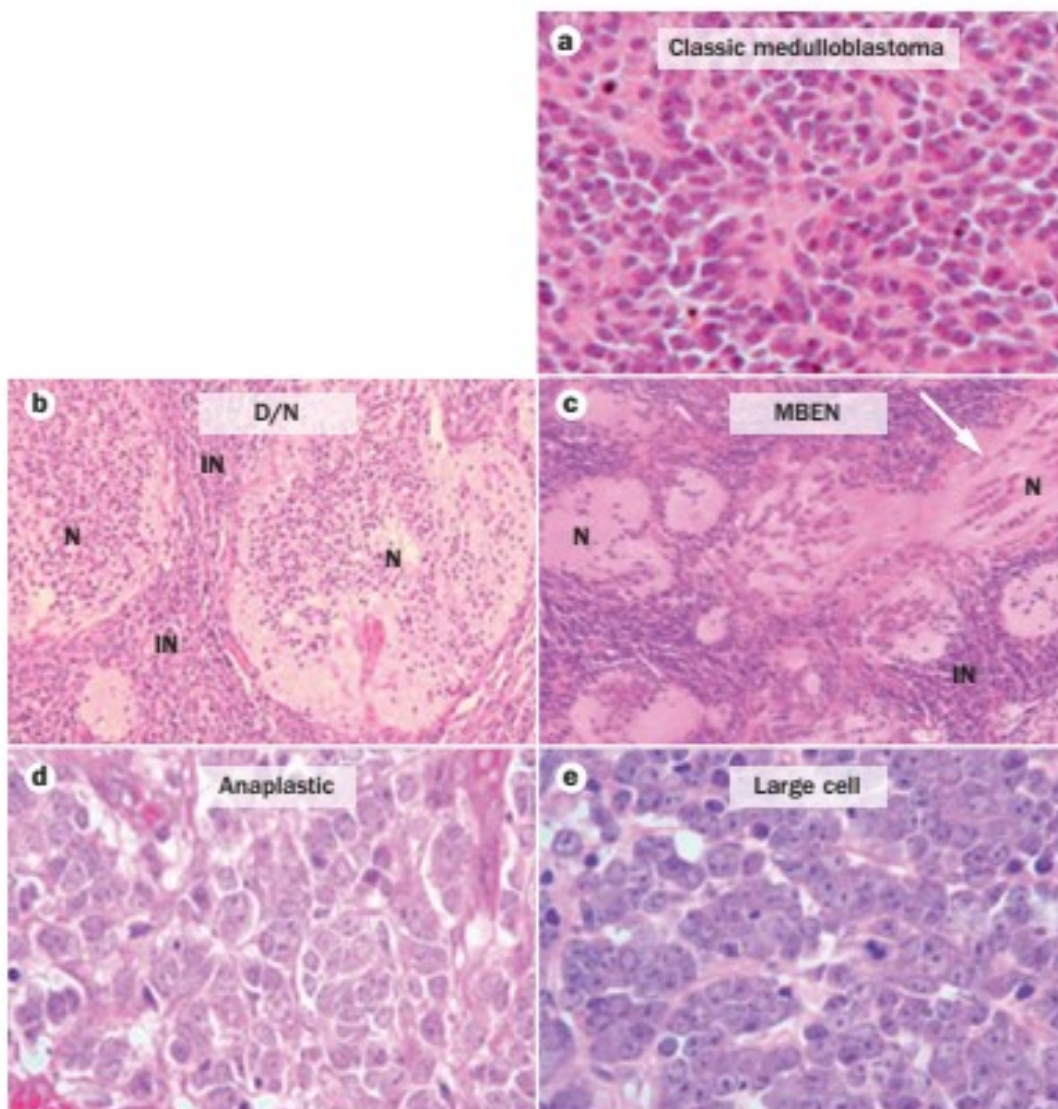
Meduloblastomy se mohou klinicky projevovat různými způsoby, dochází např. k narušení základních mozečkových funkcí (udržování rovnováhy a koordinace pohybů) (Zitterbart, et al. 2010). Jsou velice agresivní a mají tendenci k metastazování, v mozkomíšním moku nacházíme nádory u 15 – 43 % pacientů. Metastáze se v pozdní fázi onemocnění mohou vyskytovat i mimo CNS, ve skeletu, kostní dřeni, játrech, plicích a mizních uzlinách.

Meduloblastomy vznikají ve vermis mozečku (střední nepárová část mozečku, fylogeneticky nejstarší) a typicky rostou do 4. mozkové komory. U dospělých se nádor nachází v 50 % případů v mozečkové hemisféře, u dětí pak méně často. MB se může vtláčet do foramina Magendi a Lusckae, následně do dalších okolních struktur, a to do středního mozku, krční míchy a mozkového kmene (Zitterbart, et al. 2010).

U pacientů často nacházíme hydrocefalus, symptomy zvýšené intrakraniální hypertenze (ICH) jako je bolest hlavy, letargie, poruchy zraku a ranní nevolnosti, také dochází k postižení mozečkových funkcí (ataxie, dysmetrie, poruchy koordinace pohybů) (MacDonald, et al. 2003). ICH je u dětí spíše pozdním příznakem, rozvine se až po dalších projevech. V kojeneckém a batolecím věku pozorujeme dráždivost, obtíže s krmením, zvracení nebo zaostávání psychomotorického vývoje.

## 5. Histologie

V roce 2007 vydala Světová zdravotnická organizace (WHO) klasifikaci nádorů centrální nervové soustavy, ze které vyplývá rozdělení meduloblastomů na základě histopatologických rysů na klasický nádor, desmoplastický/nodulární (D/N), meduloblastom s extenzivní nodularitou (MBDEN), anaplastický meduloblastom (A) a velkobuněčný meduloblastom (LC) (viz obrázek 1). Toto histologické rozdělení se běžně používá v klinické praxi. MBEN a D/N meduloblastomy u dětí mají lepší prognózu než klasické nádory, kdežto velkobuněčné a anaplastické nádory se chovají agresivně (Ellison 2010).



Obrázek 1 – Histologické rozdělení MB (Ellison 2010)



### Klasický meduloblastom

Klasický meduloblastom tvoří plochy malých buněk s vysokým N/C (jádra k cytoplazmě) poměrem a střední jadernou polymorfií.

### Desmoplastický/nodulární meduloblastom

Nádorová tkáň desmoplastického/nodulárního meduloblastomu obsahuje noduly z diferenciovaných nervových buněk, internodulární regiony jsou charakterizovány nediferenciovanými embryonálními buňkami a retukulin-pozitivními vlákny kolagenu. Je typický pro molekulární podskupinu meduloblastomů Sonic Hedgehog (SHH), kterou popíši později.

### Meduloblastom s extenzivní nodularitou

Meduloblastom s extenzivní nodularitou (MBEN) se jeví podobně jako D/N histologie. Tato varianta má také nodulární a internodulární místa, nodulární části jsou ale častější. Je také typická pro SHH podtyp meduloblastomů.

### Anaplastický meduloblastom










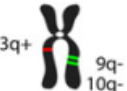
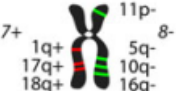

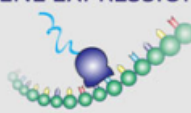
Histologie anaplastického meduloblastomu je charakterizována jaderným pleomorfismem, vysokým počtem mitóz a množstvím apoptózních buněk.

### Velkobuněčný meduloblastom

Velkobuněčné meduloblastomy vypadají následovně: monomorfní buňky s velkým jádrem a nápadným jadérkem. Často je tento typ nacházen společně s anaplastickou histologií ve stejném nádoru, tudíž obě varianty jsou shrnuty do skupiny LC/A.

## 6. Rozdělení do molekulárních podskupin

Rozdělení do skupin dle molekulárních znaků je zásadní pro současnou a budoucí léčbu, jelikož umožňuje cílení specifických látek a způsobů léčby. Od prvních studií, kdy byly rozděleny meduloblastomy do 5 skupin, a to A, B, C, D a E (Thompson, et al. 2006), přes další zkoumání a upřesňování (Kool, et al. 2008) až k současnému stavu a to rozdělení do 4 skupin: WNT, SHH, C skupina (skupina 3), D skupina (skupina 4) (Northcott, et al. 2011). Jednotlivé skupiny se liší svými molekulárními znaky, klinickými průběhy a jsou asociovány s různými prognózami (viz obrázek 2). WNT a SHH skupiny mají charakteristické znaky, avšak i pro skupiny C a D se podle poslední studie podařilo najít odlišné znaky. Toto rozdělení se zdá přesné, z 294 analyzovaných nádorů byl pouze jeden, který podle této studie nevykazoval rozdíl mezi skupinou 3 a 4 (Northcott, et al. 2012b).

Molecular Subgroups of Medulloblastoma				
CONSENSUS	WNT	SHH	Group 3	Group 4
Cho (2010)	C6	C3	C1/C5	C2/C4
Northcott (2010)	WNT	SHH	Group C	Group D
Kool (2008)	A	B	E	C/D
Thompson (2006)	B	C', D	E, A	A, C
<b>DEMOGRAPHICS</b>				
Age Group:   				
Gender: ♀ ♂	♂♂ : ♀♀	♂♂ : ♀♀	♂♂ : ♀	♂♂ : ♀
<b>CLINICAL FEATURES</b>				
Histology	classic, rarely LCA	desmoplastic/nodular, classic, LCA	classic, LCA	classic, LCA
Metastasis	rarely M+	uncommonly M+	very frequently M+	frequently M+
Prognosis	very good	infants good, others intermediate	poor	intermediate
<b>GENETICS</b>				
	 CTNNB1 mutation	 PTCH1/SMO/SUFU mutation GLI2 amplification MYCN amplification	 i17q MYC amplification	 i17q CDK6 amplification MYCN amplification
<b>GENE EXPRESSION</b>				
	WNT signaling MYC +	SHH signaling MYCN +	Photoreceptor/GABAergic MYC +++	Neuronal/Glutamatergic minimal MYC / MYCN

Obrázek 2 – Rozdělení meduloblastomů do 4 skupin (Schroeder and Gururangan 2014a)

## 7. WNT

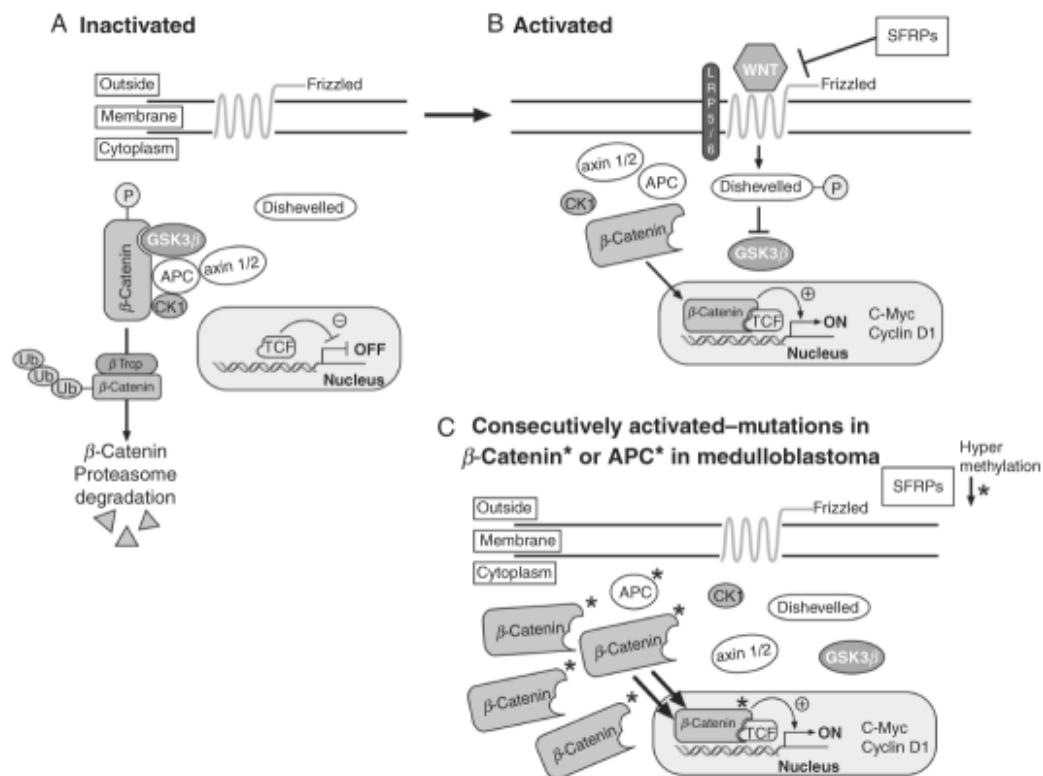
WNT skupina meduloblastomů je pojmenovaná po WNT (Wingless/Int-1) proteinu a první důkaz, který potvrdil vliv této dráhy při vzniku meduloblastomů pochází z genetické studie pacientů s Torcutovým syndromem, u nichž byl výskyt MB 82x vyšší než u běžné populace (Hamilton, et al. 1995).

Tato dráha (viz obrázek 3) je důležitá nejen při embryonálním vývoji, ale ovlivňuje i řadu dějů v buňce, a to např. buněčné dělení nebo buněčný pohyb. Kanonická WNT signální dráha užívá k přenosu signálu  $\beta$ -katenin, který se podílí také na tvorbě adherentních spojů mezi buňkami. Signály jsou přenášeny proteiny z rodiny WNT, jež se skládá z 19 glykoproteinů. Tyto proteiny se vážou na buněčné receptory z rodin FZ (Frizzled) a LPR (lipoprotein receptor related). Přenosem signálu dochází k expresi cílových genů, které ovlivňují další procesy v buňce. Pokud nedojde k navázání ligandu na receptor, formuje se v cytoplazmě destrukční komplex, který je zodpovědný za fosforylaci a následnou degradaci  $\beta$ -kateninu (Roussel and Hatten 2011).

K aktivaci dráhy dochází při navázání ligandu WNT na FZ, který je propojen s receptorem LRP. To vede k fosforylaci DVL (Dishevelled), asociaci s dalšími proteiny a zabránění fosforylace  $\beta$ -kateninu. Stabilizovaný  $\beta$ -katenin je poté translokován do jádra, kde reaguje s transkripčními faktory TCF (T-cell factor) a LEF (Lymphoid enhancer factor) a způsobuje aktivaci transkripce cílových genů jako jsou *MYC*, *JUN*, *FRA*, *AXN2* a *CCND1* (Li, et al. 2015).

Více než 75 % těchto nádorů má bodové mutace na exonu 3 v genu pro  $\beta$ -katenin *CTNNB1*. Ten je součástí komplexu společně s kinázou *GSK-3 $\beta$*  (glykogen syntáza-kináza 3 $\beta$ ), axiny 1 a 2, *APC* (adenomatous polyposis coli) a *CK1a* (kasein kináza A). Hladina  $\beta$ -kateninu je normálně regulována fosforylací *GSK-3 $\beta$*  vedoucí k ubikvitinaci a degradaci pomocí proteazomu. Mutace v *APC* nebo v *CTNNB1* pak vedou k aktivaci WNT dráhy a tím indukují trvalou transkripci pro-proliferačních cílových genů zahrnujících *CCND1* a *MYC* (Roussel and Hatten 2011).

Nádory této dráhy jsou typicky charakterizovány delecí jedné kopie chromozomu 6, tzv. monosomií 6. Toto zjištění však nemůže být použito v prognóze, jelikož se vyskytuje i u jiných skupin MB (Shih, et al. 2014).



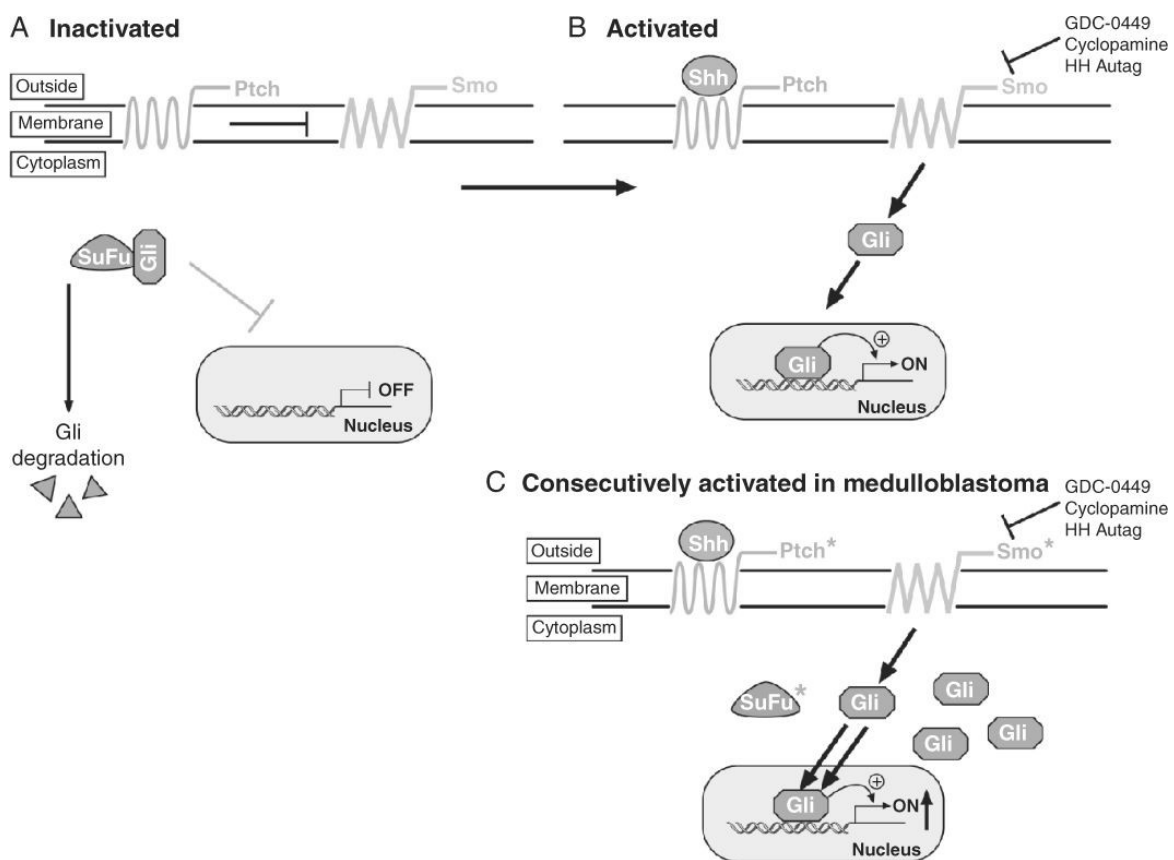
Obrázek 3 – Schéma WNT dráhy ((Roussel and Hatten 2011)

Meduloblastomy WNT skupiny se objevují pouze u 10 – 15 % MB pacientů, jsou běžně viděny u dětí starších 3 let a dospělých, přičemž nejvyšší výskyt je u dětí ve věku 10 – 12 let. Poměr mezi muži a ženami je stejný, podle některých studií vyšší u žen (Massimino, et al. 2016). Histologicky se jedná o klasické typy nádorů, výjimečně se objeví meduloblastomy s LC/A histologií. Metastáze jsou mnohem méně časté než u ostatních skupin. V této skupině se uzdraví nejvyšší procento pacientů, důvod nebyl dlouho zřejmý, studie z roku 2016 (Phoenix, et al. 2016) ho objasňuje.

WNT meduloblastomy jsou léčitelné i v případě, kdy metastazují a obsahují aktivní mutace v *CTNNB1*. Dochází zde k paradoxu, kdy mutant *CTNNB1*, který řídí stálou onkogenní WNT signalizaci a zároveň umlčuje WNT signalizaci v okolních endoteliálních buňkách díky sekreci inhibitorů. Následkem toho se mění vlastnosti hematoencefalické bariéry (BBB – blood brain barrier), díky čemuž jsou nádory svolnější k systematické chemoterapii a tím léčitelnější (Phoenix, et al. 2016).

## 8. SHH

Sonic hedgehog (SHH), po kterém je pojmenovaná jedna zásadní skupina medulloblastomů, je protein, který (společně s dalšími hedgehog proteiny – Indian a Desert) je ve zdravém organismu ligandem v signální dráze (viz obrázek 4) pojmenované po této rodině proteinů. SHH signální dráha hraje nezbytnou úlohu v organogenezi, v mozku zahajuje proliferaci nervových buněčných prekurzorů, které zajišťují jeho správný vývoj (Massimino, et al. 2016). SHH ligand je běžně sekretován pomocí Purkyňových buněk a zajišťuje formaci vnější germinální vrstvy mozečku.



Obrázek 4 – Schéma SHH dráhy (Roussel and Hatten 2011)

V neaktivní stavu při absenci SHH inhibuje receptor PTCH (Patched) protein SMO (Smoothened), čímž potlačuje SHH dráhu. Při aktivaci této dráhy se sonic hedgehog po dosažení cílové buňky váže na receptor PTCH. Tím dojde k odblokování receptoru SMO a dále se aktivují další složky této dráhy (Ingham and McMahon 2001). SMO aktivuje GLI1 (glioma-associated oncogene) a GLI2 transkripční faktory, ty jsou jinak inhibovány SUFU (suppressor of fused) a inaktivuje transkripční inhibitor GLI3. Ty dohromady regulují transkripční program (Roussel and Hatten 2011). Gli1 a Gli2 transkripční faktory aktivují transkripci jiných pro-proliferčních genů, zahrnující *MYCN*, cykliny D1 a D2 a cyklin E. Následně transkripční faktor

MYCN indukuje expresi mnoha dalších genů a microRNA, mezi které patří miR-17~92 klastry a také potlačuje expresi dvou inhibitorů cyklin-dependetních kináz, p18<sup>Ink4c</sup> (inhibuje aktivitu Cdk4 a Cdk6 v komplexu s cykliny D1 a D2) a p27<sup>Kip1</sup> (potlačuje aktivitu cyklinu E a A v komplexu s Cdk2). Tyto komplexy fosforylují Rb a p107 a tím regulují buněčný cyklus, konkrétně přechod fáze G1 a vstup do S fáze (Roussel and Hatten 2011).

SHH podskupina meduloblastomů se nachází u 25 % pacientů. Věk pacientů není rovnoměrně rozložen, nýbrž se dvěma vrcholy, u kojenců (0 – 3 roky) a mladých dospělých (<16 let), ve věku 4 – 16 let se vyskytuje méně. Některé výzkumy odhalily větší míru onemocnění u žen, nicméně z celkového pohledu je pravděpodobnost onemocnění u obou pohlaví stejná (Schroeder and Gururangan 2014b). Většina D/N nádorů patří mezi SHH skupinu meduloblastomů, nicméně D/N nádory tvoří méně než polovinu meduloblastomů SHH podskupiny (Taylor, et al. 2012).

Jedinci s mutací v SHH receptoru *PTCH* v zárodečné linii trpí Gorlinovým syndromem, což je onemocnění spjaté s meduloblastomy, o němž se zmíním dále. K nádorům může dojít i při mutacích, amplifikacích i delecích dalších komponentů SHH dráhy, a to *SUFU*, *GLI2* a dalších (Schroeder and Gururangan 2014b). S nízkým klinickým nálezem se u těchto meduloblastomů nachází amplifikace *C-MYC* a častěji *N-MYC*. (Leung, et al. 2004)

Na myších modelech se ukázalo, že aktivace SHH dráhy skrz manipulace hlavních efektorů zahrnujících *Ptch*, *Smo* a *Sufu* dá vzniknout meduloblastomům. Homozygoti v *Ptch* zemřeli ve stádiu embrya, u 19 % hemizygotů se rozvinul nádor připomínající lidský MB do 25 týdnů po narození. Také u mutantů v *Sufu* (heterozygot) a zároveň se ztrátou *Trp53* dochází ke tvorbě nádoru. (Lee, et al. 2007)

Na chromozomální úrovni dochází ke vzniku MB s největší frekvencí (21 – 47 %) při ztrátě 9q raménka. Další chromozomální aberace způsobující tento nádor jsou amplifikace 3q a 9p částí a ztráta 10q, 20p a 21p. (Northcott, et al. 2011)

Předklinická data ukazují, že inhibitory Hedgehog drah by se mohly stát důležitým léčebným postupem pro pacienty s tímto typem meduloblastomů. Cílení na pozitivní regulátor této dráhy se ukázalo jako efektivní metoda pro část pacientů, ale díky rezistenci nebo přítomnosti mutací nereagují všichni pacienti na SMO inhibitory (Kieran 2014).

## 9. C skupina

Skupina C, často nazývaná také skupina 3, patří mezi non-SHH/WNT nádory společně se skupinou D. Markerem této skupiny byl navržen *NPR3* (Natriuretic Peptide Receptor 3), avšak ne všichni s tím souhlasí, jelikož slabá *NPR3* exprese může být detekovaná ve WNT skupině (Min, et al. 2013).

Tato skupina se vyskytuje s větší pravděpodobností u mužů než u žen (2:1), také častěji u batolat a dětí než u dospělých (u těch vzácně). Nejčastější histologií jsou LC/A meduloblastomy. Ze všech 4 skupin má tato nejvyšší incidenci metastatické formy a celkově se vyskytuje u 25 – 27 % pacientů trpících meduloblastomy (Northcott, et al. 2011). Nebyly popsány žádné mutace v zárodečné linii asociovány se skupinou C.

Bylo naznačeno, že by se tato skupina mohla nazývat MYC skupinou (Hatten and Roussel 2011), nicméně u WNT skupiny MB je také vysoká exprese *MYC*. *MYC* amplifikace (ale ne *MYCN* amplifikace) se ukazuje limitní pro tuto podskupinu meduloblastomů. Amplifikace a s ní spojená overexprese meduloblastomového onkogenu *OTX2* se zde také vyskytuje (de Haas, et al. 2006).

Genom pacientů této skupiny je velice nestabilní, vyskytují se zde časté zisky chromozomů, a to 1q, 7 a 17q společně se ztrátou 5, 10q, 11, 16q a 17p. Tetraploidie v nádorech se nachází u 54 % pacientů a tyto nádory ukazují značně vyšší variabilitu počtu kopií než jejich diploidní protějšky. Chromotripsis (mechanismus způsobující genomovou přestavbu nádorových a zárodečných buněk) se často objevuje v tomto nádoru a vede k zvláštnímu chromozomálnímu znovuospořádání nebo fúzi genů při pokusu o DNA opravu. Jedním takovým příkladem je fúze *MYC/PTV-1* (mezi exonem 1 a 3 *PTV-1* a exonem 2 u *MYC*), která se vyskytuje u 60 % případů s *MYC* amplifikací (Northcott, et al. 2012a).

Nedávno byly popsány myší modely, které zpřesňují patologii a biologické chování těchto nádorů. Expresí stabilní formy *MYC* virovou infekcí do CD133+ nervových kmenových buněk odvozených z postnatálních myších mozečků způsobila rychlou buněčnou proliferaci. Když byly tyto buňky transplantovány do mozečkové hemisféry imunodeficientních myších, formovaly spontánně masu buněk (Pei, et al. 2012).

## 10. D skupina

Poslední skupina, skupina D (skupina 4), je nejběžnější typ meduloblastomů. Více než 35 % všech případů se dá zařadit právě do této skupiny nádorů. Ovšem je nejméně prozkoumána a stále je třeba rozluštit mnohé o buněčném původu a signalizačních drahách, které ji provázejí (Schroeder and Gururangan 2014b).

D skupina se nachází u pacientů každého věku, ale je vzácná u malých dětí. Výrazný je zde poměr mezi muži a ženami (3:1), prognóza je střední. Neznáme žádné mutace v zárodečné linii. Většina nádorů je klasické histologie, byly ale také pozorovány LC/A typy (Taylor, et al. 2012). Třetina pacientů, zejména mladí dospělí, mají v diagnóze metastatické nádory.

Podobně jako u skupiny C se zde vyskytuje tetraploidie (40 % případů) (Schroeder and Gururangan 2014b). Izochromozom 17q, který je viděn i u nádorů skupiny C (26 %), je častější u skupiny D, kde je nejběžnější cytogenetickou změnou, která je pozorována v 66 % případů (Kool, et al. 2008). Podobně je pozorována delece 17p u obou skupin, která není viděna u skupin SHH a WNT. Většina žen trpících nádorem skupiny D nemá jednu kopii chromozomu X. Protože u mužů je vyšší procento výskytu MB skupiny D, ukazuje to pravděpodobnost existence jednoho nebo více supresorových genů na tomto chromozomu. Na chromozomu X se nachází také gen *KDM6A* (Gajjar and Robinson 2014).

Mutace chromatin remodelujících genů jako je *KDM6A* (demetyláza lyzinu-27 na histonu H3) může navozovat situaci, u které nádorové buňky připomínají neurální kmenové buňky (Gajjar and Robinson 2014). Dalšími geny, u kterých mutace ovlivňuje remodelaci, jsou *ZMYM3*, *CHD7* a *EZH2*, které udržují neurální kmenové buňky v nediferenciovaném stavu a mohou způsobovat tumorogeneze (Schroeder and Gururangan 2014a). Mutované mohou být také: *OTX2* (amplikony), *DDX31* (delece), *GFI1/GFI1B* (aktivace exprese), *KMT2D* a *KMT2C* (mutace) (Gajjar and Robinson 2014). Na rozdíl od skupiny 3 mají nádory této skupiny více amplifikací *MYCN* než *MYC* (Roussel and Robinson 2013).

Celková charakteristika exprese *MYC* a *MYCN* by se dala shrnout následovně: SHH nádory mají vysokou hladinu exprese *MYCN*, WNT skupina a skupina C mají vysokou expresi *MYC* a skupina 4 má relativně nízkou produkci *MYC* i *MYCN*, vyjma několika málo případů pacientů, u kterých se našla *MYCN* amplifikace (Kool, et al. 2008).



Nejfrekventovanější somatická aberace počtu kopií, která se objevuje u 10 % pacientů, je zisk části chromozomu 5q23.2, jde především o gen *SNCAIP*. Tento gen kóduje synfilin-1, který společně s  $\alpha$ -synukleinem podporuje formaci Lewyho tělíska v mozku pacientů s Parkinsonovou chorobou. Spojení mezi *SNCAIP* funkcí a meduloblastomy ale zatím nebylo stanoveno (Northcott, et al. 2012b).

### 11. Genetické syndromy spojené s meduloblastomy

Pacienti trpící Gorlinovým syndromem, Turcotovým syndromem nebo LiFraumeniho syndromem mají zvýšený výskyt meduloblastomů.

#### Gorlinův syndrom

Gorlinův syndrom neboli syndrom bazocelulárního névu je vzácná, autozomálně dominantní dědičná choroba, která je charakterizována rozvojem bazálních buněčných karcinomů v mladém věku. Tato porucha je způsobena defektem v hedgehog signalizační dráze, což se projevuje konstitutivní aktivitou této dráhy a proliferací nádorových buněk (Bresler, et al. 2016). Téměř všechny pacienty postihnou kožní nádory (vícečetné bazaliomy), 10 % pacientů nádory zadní jámy lební, z čehož polovina jsou desmoplastické meduloblastomy (nejvíce u dvouročních dětí) (Plevová, et al. 2009).

Z hlediska molekulární patogeneze se ukazuje, že konstitutivní aktivitu způsobují mutace v genu *PTCH1* a *SUFU*. Mechanismus signální dráhy SHH je vysvětlen výše. Ukazuje se, že pacienti s touto genetickou poruchou a mutacemi v *SUFU* mají zvýšené riziko pro desmoplastické meduloblastomy (Smith, et al. 2014).

K léčení byla zkoušena cílená terapie pomocí látky Vismodegib, což je látka schválená FDA (Food and Drugs Administration) pro léčbu bazocelulárního karcinomu.

#### Turcotův syndrom

Turcotův syndrom je dědičná (názory na dominanci se liší) choroba způsobující u postižených výskyt mnohonásobných střevních polypů a mozkových nádorů (multiformní glioblastomy nebo meduloblastomy). Je asociován s mutacemi v zárodečné linii v těchto genech: *APC*, *MLH1*, *MHS6*, *PMS2*, a *MSH2* (Lebrun, et al. 2007).

Můžeme ho rozdělit na dvě skupiny: Familiární adenomatózní polypóza a HNPCC (Lynchův syndrom). U první je alterace v zárodečné linii v genu *APC* detekována v 80 % případů.

Tento gen se nachází na části chromozomu 5q21 a patří ke skupině tumor supresorových genů, protein potlačuje proliferaci buněk inhibicí  $\beta$ -kateninové transkripční aktivity (Ozerov, et al. 2013). Přibližně u 60 % pacientů tohoto podtypu se nacházejí meduloblastomy.

U Lynchova syndromu se nachází mutace v zárodečné linii ve zbylých výše zmíněných genech, což vede k rozšířené nestabilitě mikrosatelitů a mutačnímu fenotypu (Lebrun, et al. 2007).

Léčba se provádí na stejných principech jako léčba pacientů se sporadickými formami polypózy/nádorů střev nebo mozku, což zahrnuje sérii operací nádoru, radiaci a chemoterapii v různých variacích (Ozerov, et al. 2013).

### Li-Fraumeniho syndrom

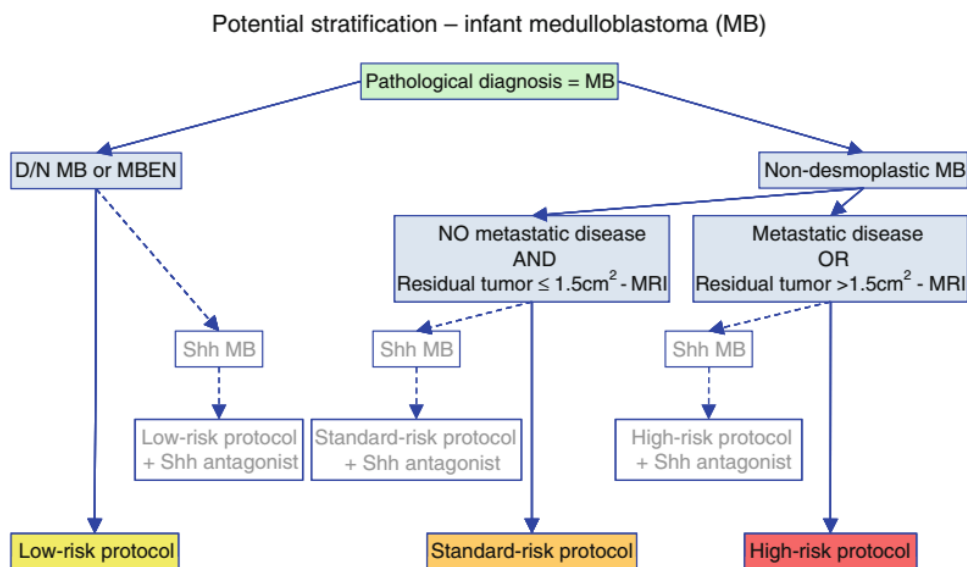
Li-Fraumeniho syndrom (LFS) je vzácná dědičná, autozomálně dominantní choroba, která zvyšuje riziko pacienta k rozvinutí synchronních a metachronních nádorů. Dnes se za klasický LFS považuje typ, který popsali právě Li a Fraumeni v roce 1969, tj. pacient se sarkomem pod 45 let, s blízkým příbuzným s rakovinou do 45 let a blízkým nebo vzdálenějším příbuzným s jakýmkoli typem rakoviny před 45. rokem života nebo sarkomem v jakémkoli věku (Li, et al. 1988).

Tato porucha je způsobena zárodečnou mutací v tumor supresorovém genu *TP53* (17p13.1) a je asociována se sarkomy kostí i měkkých tkání, karcinomy nadledvin, nádory mozku, nádory prsu, leukemiemi a lymfomy (Malkin 2011). Tento gen je důležitým regulátorem buněčného cyklu a apoptózy, je to transkripční faktor kontrolující přechod z G1 do S fáze cyklu. Gen, který může také souviset s LFS je *CHEK2* (22q12.1), jenž kóduje protein kinázu regulující buněčný cyklus (Foretová, et al. 2012).

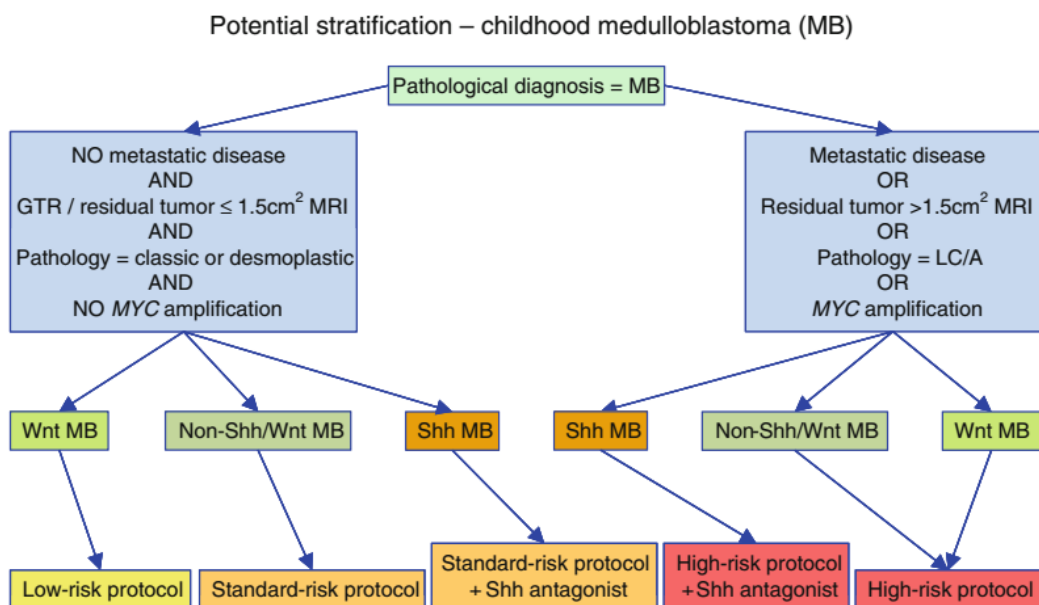
V kontextu s meduloblastomy se ukazuje zajímavé zjištění, a to že mutace *TP53* byla nalezena u 21 % pacientů s MB SHH podskupiny, ze kterých 56 % mělo mutace v zárodečné linii (Zhukova, et al. 2013). Genomová sekvenace ukazuje, že SHH nádory u LFS pacientů mají zásadní chromozomální přeskupení nebo chromotripsy (Rausch, et al. 2012).

## 12. Terapie

Navzdory pokroku v rozdělení meduloblastomů do podskupin není stoprocentní jistota, co se týče nových léčebných postupů, a proto se pokračuje ve standardní léčbě. Ta zahrnuje maximální chirurgické vyjmutí nádoru, které je následované radiací a chemoterapií. Intenzita pomocné terapie závisí na tom, do jaké skupiny rizika je pacient zařazen (viz Obrázek 5 a 6) (Martin, et al. 2014).



Obrázek 5 – Potenciální rozdělení pacientů malých dětí (Ellison 2010)



Obrázek 6 – Potenciální rozdělení dětských pacientů (Ellison 2010)

## *Operace*

### *Obstrukční hydrocefalus*

Nádory mají tendenci růst ve střední části mozečku, což způsobuje, že pacienti s meduloblastomy vykazují znaky a symptomy zvýšeného nitrolebního tlaku (ICP) vyplývajícího z obstrukčního hydrocefalu. Většina pacientů zaznamenala bolení hlavy, nauzeu a nevolnosti v době trvání od několika týdnů až měsíců před definitivní přítomností nádoru. Malé děti mohou vykazovat podrážděnost a poruchy v krmení.

Na základě závažnosti hydrocefalu chirurg může vybrat, jestli provede proceduru odklonění mozkomíšního moku před nebo současně s definitivní resekci nádoru.

### *Maximální chirurgická resekce nádoru*

Je to standardní způsob léčby tohoto typu nádorů. Přibližně 25 % pacientů podstupujících resekci si vyvine nějaký stupeň mozečkového mutismu (soubor neurologických symptomů). Další komplikace mohou být: přerušení přívodu krve, což způsobuje infarkt obklopujícího mozku nebo krvácení, které způsobí subdurální hematom.

### *Radiační terapie*

Radiační terapie (XRT) začíná přibližně 30 dnů po operaci. Skládá se z denní dávky 1,8 Gy do celkové 54-59,4 Gy.

### *Léčba mikrometastické nemoci*

Provádí se pomocí kraniospinální radiace (CSI), kterou je ozářen celý mozek a mícha po prvních 13 dní terapie. Komplikace XRT pro dětské pacienty jsou značné. Vedlejší efekty radiace jako je anorexie a nauzea jsou běžné. Děti mají také slabší imunitu a jsou náchylnější k bakteriálním onemocněním. Vystavení se radiaci také vede ke ztrátě vlasů a/nebo vzniku sekundárních nádorů, zahrnujícím meningiomy a glioblastomy.

### *Farmakologická léčba*

Cílem chemoterapie je potlačení nádorů a mikrometastatického onemocnění. Léky (stejně jako u většiny chemoterapeutik) afektují rychle dělící se buňky, zahrnující i buňky v gastrointestinálním traktu, vlasové folikuly a kostní dřeň. Toto vede k riziku nauzey a zvracení, průjmu nebo zácpě, ztrátě vlasů a myelosupresi.

### *Fyzická terapie*

Multidisciplinární rehabilitační služby jsou doporučeny pro všechny pacienty prošlé terapií MB. Po operaci by měli všichni pacienti podstoupit fyzickou terapii, pokud došlo k mozkovému mutismu nebo jiným jazykovým poruchám, měla by být zahrnuta i terapie řeči.

### *Nově objevující se terapie*

Díky rozdělení do jednotlivých skupin bude možno léčbu lépe cílit. Výzvou je určení podskupiny stejně rychle jako první diagnózy MB. Diagnostika MB by ale měla být kompletní do 30 dnů po iniciační resekci, protože pozdější začátek terapie se prezentuje horšími výsledky.

WNT nádory mohou být rozpoznány v 80 % případů podle imunohistochemického značení pro  $\beta$ -katenin a je studováno několik metod léčby, které by se daly v budoucnu použít. Specifické farmakologické cílení WNT dráhy není úplně jasné, i když snížení  $\beta$ -kateninové dráhy pomocí inhibice tankyrázy, cyklo-oxygenázy a porcupinu je studováno. To by se dalo využít v následné redukci CSI dávek nebo vynechání XRT celkově. SHH skupina může být cílena malými molekulami inhibitorů (syntetické deriváty cyklopaminu) proti SMO. U skupiny C je aplikace cílené léčby velmi důležitá, protože stávající metody jsou značně neefektivní (Gajjar and Robinson 2014). Pro skupinu C se také vyvíjí malé inhibitory, které cílí např. MYC promotor, což se ukázalo slibné proti MB *in vitro*. Skupina 4 nemá dominantní onkogenní cestu, takže cílené molekuly zůstávají zatím neobjevené.

Dalšími možnostmi jsou imunologické terapie, terapie adaptivními T-buňkami, terapie adaptivními NK (natural killers) buňkami nebo blokáda imunitního checkpointu (Martin, et al. 2014).

### *Látky*

Klasická farmakologická léčba zahrnuje toxické látky, jejichž toxicita v kombinaci s operacemi a radioterapií ještě vzrůstá. Novými kandidáty pro lepší klasickou léčbu MB jsou například: kurkumin, prostaglandin, superoxid dismutáza nebo kys. retinová (Sumer-Turanligil, et al. 2013).

### 13. Subtypy u dospělých

I když jsou meduloblastomy nejběžnějšími nádory u dětí, u dospělých se vyskytují v 1 % všech případů nádorů CNS (Abacioglu, et al. 2002). Přibližně 24 % případů MB se diagnostikuje mezi 21. a 40. rokem života (Carrie, et al. 1993). Na základě předpokladu, že nádory dospělých pacientů mají stejné vlastnosti jako nádory u dětí, jsou dospělým aplikovány léčebné protokoly odvozené od těch dětských.

Avšak byly nalezeny důležité molekulární, radiologické a klinické rozdíly mezi dětskými a dospělými pacienty (Remke, et al. 2011). Rozdíly nenacházíme pouze v jednotlivých skupinách (SHH podskupina je nejčastější u dospělých a malých dětí, WNT a skupina C jsou vzácné u malých dětí, skupina 3 se téměř nenachází u dospělých), ale i v místě vzniku nádoru, nádory u dospělých se nachází v bočních mozečkových hemisférách, u dětí ve vermis. Nádory WNT a C skupiny u dospělých jsou spojeny s horším výsledkem než u dětí, kdežto nádory skupiny SHH mají u obou skupin výsledek podobný (Kool, et al. 2012). U dospělých je také častější pozdní relaps (Kostaras and Easaw 2013). Meduloblastomy u dospělých jsou pokročilejší nádory, s častější gliovou diferenciací a s vyšším proliferčním potenciálem (Giordana, et al. 1997).

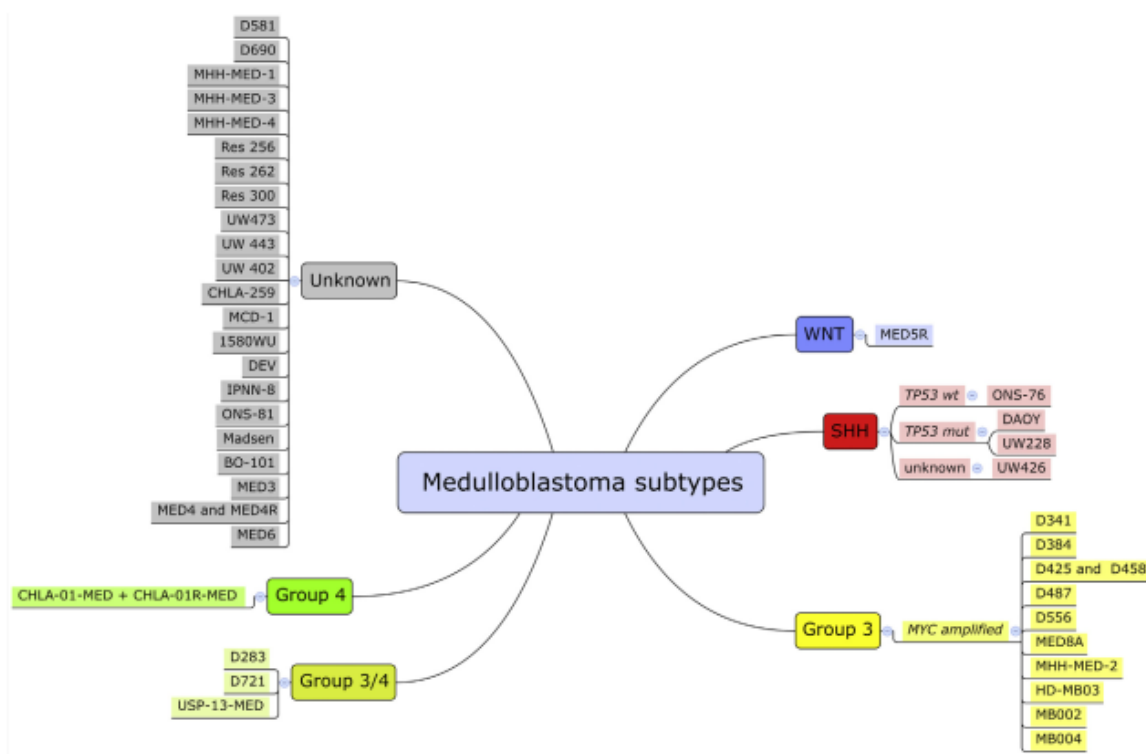
### 14. Metody výzkumu

Nové metody, jakými jsou imunohistochemické barvení, microarray a sekvenování nové generace, odtajnily značné informace o fungování meduloblastomů. Kombinace těchto metod nám umožňuje zkoumat MB do hloubky za účelem lepšího porozumění a léčby.

### 15. Dostupné linie

Ke studiu MB se používají *in vitro* modely, které všeobecně mají výhodu v tom, že umožňují použití lidské derivované tkáně, množení buněk a jejich použití v širokém spektru experimentů. Kultury primárních meduloblastomů nejvíce připomínají *in vivo* stádium, ale zároveň jsou často heterogenním mixem odlišných buněk. Po první pasáži jsou buňky dány do média, které na ně má selekční tlak. Ten vede k tomu, že zavedené buněčné linie jsou lehce množitelné a relativně uniformní, tudíž ukazují menší variabilitu oproti primárním kulturám (Ivanov, et al. 2016).

Během posledních 4 dekad bylo nashromážděno a stabilizováno okolo 44 buněčných linií meduloblastomů, ale celkový obraz byl nejasný kvůli veliké diverzitě v charakteristice jednotlivých metod. Nicméně podařilo se přiřadit molekulární subtyp alespoň některým z nich (viz obrázek 7).



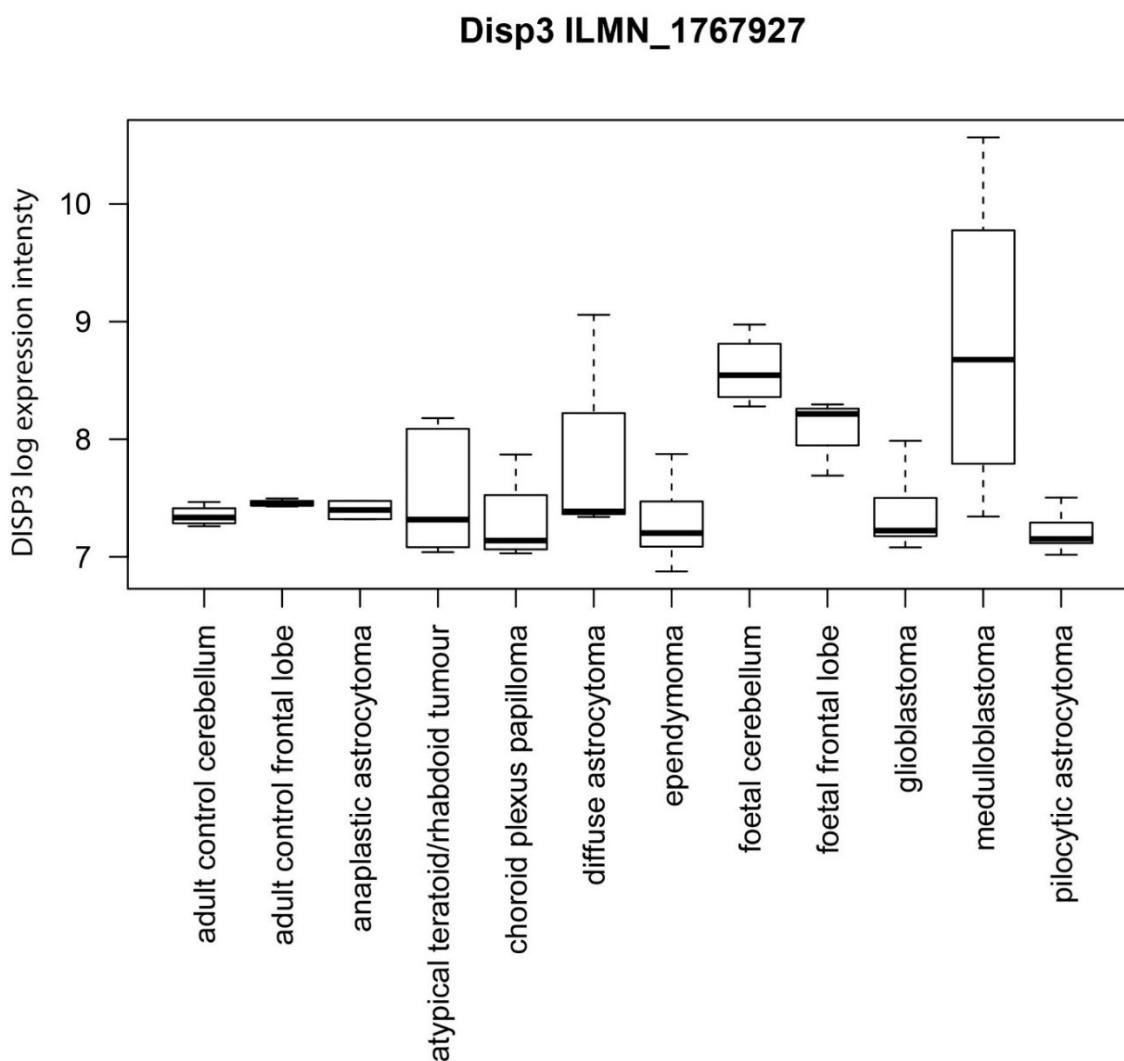
Obrázek 7 – Přehled buněčných linií MB (Ivanov, et al. 2016)

*In vitro* kultury se i přesto významně liší od nádoru v mozečku člověka, mají nízkou buněčnou hustotu, málo kontaktů s dalšími buňkami a s extracelulárním prostorem a nejsou vystaveny stejným nutričním podmínkám a fyziologickým hladinám kyslíku. Relativně novým zajímavým způsobem kultivace buněk se staly mnohobuněčné organoidy, trojrozměrné tkáně, které umožňují buňkám stejné chování jako v přirozeném prostředí. Ještě účinnější se ukazují kultury, kde spolupracují nádorová tkáň s tkání normální (Ivanov, et al. 2016).

## 16. Bioinformatická data

V laboratoři buněčné diferenciaci v Ústavu molekulární genetiky AVČR se zabýváme genem *DISP3/PTCHD2*, který kóduje transmembránový protein vysoce exprimovaný v nervové tkáni. Ektopická exprese *DISP3* v multipotentních mozečkových progenitorech podporuje buněčnou proliferaci a ovlivňuje expresi genů účastnících se tumorogeneze (Konirova, et al. 2017). U medulloblastomů byla také nalezena zvýšená hladina mRNA tohoto genu (Zikova, et al. 2014).

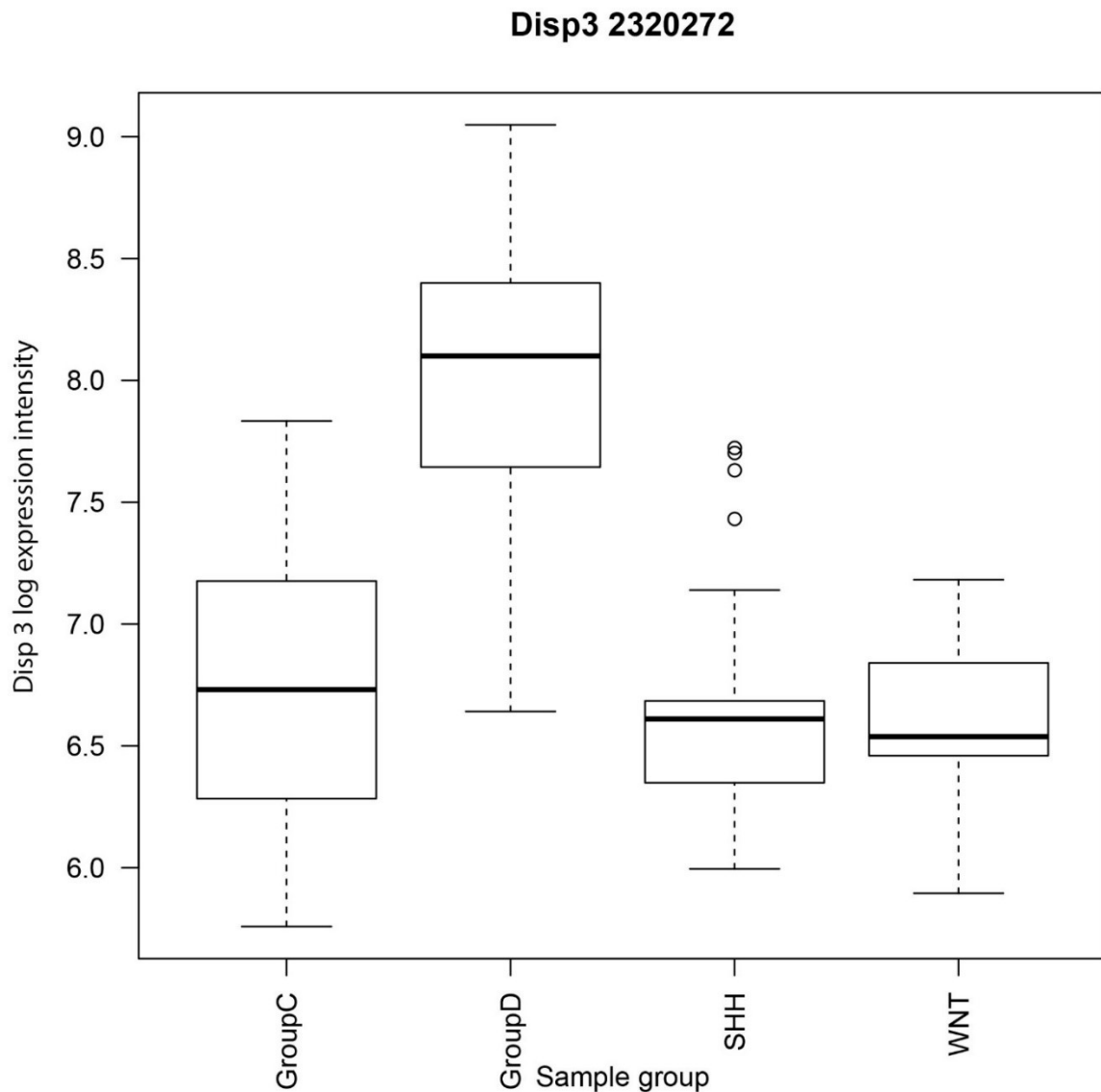
Z databáze Arrayexpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) analýza DNA čipů (E-GEOD-42658) ukazuje vysokou expresi *DISP3* genu v MB ve srovnání s kontrolním vzorkem zdravého dospělého mozečku. V dalších nádorech pozorujeme rozmanitou intenzitu exprese *DISP3*, v embryonálním zdravém mozečku je také zvýšená (viz obrázek 8).



Obrázek 8 – Graf logaritmicke intenzity exprese *DISP3* v závislosti na druhu nádoru



Při detailnější analýze jednotlivých molekulárních skupin MB z datasetu E-GEOD-21140 zahrnujícího 103 pacientů se ukazuje, že nejvyšší exprese tohoto genu je ve skupině D (viz obrázek 9). To naznačuje, že tento gen by se mohl podílet na vzniku této podskupiny MB. Je na dalších výzkumech, aby ukázaly, jakým způsobem a zdali se tento poznatek nedá využít v cílené terapii.



Obrázek 9 – Intenzita exprese DISP3 v podskupinách meduloblastomů

## 17. Závěr

V této práci jsem se zaměřila na přehled meduloblastomů, na jejich subtypy, metody léčby a nové pokroky objevené v souvislosti s touto problematikou. Je důležité pochopit, jak jednotlivé nádory fungují, jak vznikají a případně jak zanikají, aby se budoucí léčba dala aplikovat ve všech případech. Nicméně v této práci jsem zjistila, že pokrok šel za poslední roky v této problematice hodně dopředu a k porozumění meduloblastomů se dostáváme stále blíž.

## 18. Seznam citací

Abacioglu, Ufuk, et al.

2002 Medulloblastoma in adults: treatment results and prognostic factors. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 54(3):855-860.

Bresler, S. C., B. L. Padwa, and S. R. Granter

2016 Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome (Gorlin Syndrome). *Head Neck Pathol* 10(2):119-24.

Carrie, C., et al.

1993 Medulloblastoma in adults: survival and prognostic factors. *Radiother Oncol* 29:301–307.

de Haas, Talitha, et al.

2006 OTX1 and OTX2 Expression Correlates With the Clinicopathologic Classification of Medulloblastomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 65(2):176-186.

Ellison, D. W.

2010 Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathol* 120(3):305-16.

Ferguson, Sherise, and Maciej S. Lesniak

2005 Percival Bailey and the Classification of Brain Tumors. *Neurosurg Focus* 18.

Foretová, L., et al.

2012 Li-Fraumeni syndrom – návrh komplexní preventivní péče o nosiče TP53 mutace s použitím celotělové magnetické rezonance. *Klin Onkol* 25:49-54.

Gajjar, A. J., and G. W. Robinson

2014 Medulloblastoma-translating discoveries from the bench to the bedside. *Nat Rev Clin Oncol* 11(12):714-22.

Giordana, Maria Teresa, et al.

1997 IS medulloblastoma the same tumor in children and adults? *Neuro-Oncology* 35:169-176.

Gopalakrishnan, Vidya, et al.

2015 Medulloblastoma development: tumor biology informs treatment decisions. *CNS oncology* 4(2):79-89.

Hamilton, Stanley R., et al.

1995 The Molecular Basis of Turcot's Syndrome. *New England Journal of Medicine* 332(13):839-847.

Hatten, M. E., and M. F. Roussel

2011 Development and cancer of the cerebellum. *Trends Neurosci* 34(3):134-42.

Ingham, Philip W., and Andrew P. McMahon

2001 Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *GENES & DEVELOPMENT* 15:3059–3087.

Ivanov, D. P., et al.

2016 In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. *J Biotechnol* 236:10-25.

Kieran, Mark W.

- 2014 Targeted treatment for sonic hedgehog-dependent medulloblastoma. *Neuro-Oncology* 16(8):1037-1047.  
Konirova, J., et al.
- 2017 Modulated DISP3/PTCHD2 expression influences neural stem cell fate decisions. *Sci Rep* 7:41597.  
Kool, M., A. Korshunov, and S. M. Pfister
- 2012 Update on molecular and genetic alterations in adult medulloblastoma. *Memo* 5(3):228-232.  
Kool, M., et al.
- 2008 Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One* 3(8):e3088.  
Kostaras, X., and J. C. Easaw
- 2013 Management of recurrent medulloblastoma in adult patients: a systematic review and recommendations. *J Neurooncol* 115(1):1-8.  
Kunschner, L. J.
- 2002 Harvey cushing and medulloblastoma. *Archives of Neurology* 59(4):642-645.  
Lebrun, C., et al.
- 2007 Turcot syndrome confirmed with molecular analysis. *Eur J Neurol* 14(4):470-2.  
Lee, Y., et al.
- 2007 Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene* 26(44):6442-7.  
Leung, Carly, et al.
- 2004 Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* 428(6980):337-341.  
Li, FP, et al.
- 1988 A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48:5358-5362.  
Li, Kay Ka-Wai, Kin-Mang Lau, and Ho-Keung Ng
- 2015 Signaling pathway and molecular subgroups of medulloblastoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8(9):11945-11945.  
MacDonald, Tobey J., et al.
- 2003 Advances in the diagnosis, molecular genetics, and treatment of pediatric embryonal CNS tumors. *The Oncologist* 8:174-186.  
Malkin, D.
- 2011 Li-fraumeni syndrome. *Genes Cancer* 2(4):475-84.  
Martin, A. M., et al.
- 2014 Management of pediatric and adult patients with medulloblastoma. *Curr Treat Options Oncol* 15(4):581-94.  
Massimino, Maura, et al.
- 2016 Childhood medulloblastoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 105:35-51.  
Min, Hye Sook, et al.
- 2013 Genetic Grouping of Medulloblastomas by Representative Markers in Pathologic Diagnosis. *Translational Oncology* 6(3):265-272.  
Northcott, P. A., et al.

- 2012a Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer* 12(12):818-34.  
Northcott, P. A., et al.
- 2012b Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* 488(7409):49-56.  
Northcott, Paul A., et al.
- 2011 Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants. *Journal of Clinical Oncology* 29(11):1408-1414.  
Ozerov, S.S., et al.
- 2013 Turcot Syndrome. A Rare Case and Literature Review. *N.N. Burdenko Journal Of Neurosurgery* 3:46-49.  
Pei, Y., et al.
- 2012 An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer Cell* 21(2):155-67.  
Phoenix, T. N., et al.
- 2016 Medulloblastoma Genotype Dictates Blood Brain Barrier Phenotype. *Cancer Cell* 29(4):508-22.  
Plevová, P., et al.
- 2009 Gorlinův syndrom. *Klin Onkol* 22:34-35.  
Rausch, T., et al.
- 2012 Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell* 148(1-2):59-71.  
Remke, M., et al.
- 2011 Adult medulloblastoma comprises three major molecular variants. *J Clin Oncol* 29(19):2717-23.  
Roussel, M. F., and G. W. Robinson
- 2013 Role of MYC in Medulloblastoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(11).  
Roussel, Martine F., and Mary E. Hatten
- 2011 Cerebellum: Development and Medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol.* 94:235–282.  
Schroeder, K., and S. Gururangan
- 2014a Molecular variants and mutations in medulloblastoma. *Pharmgenomics Pers Med* 7:43-51.  
Schroeder, Kristin, and Sri Gururangan
- 2014b Molecular variants and mutations in medulloblastoma. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 7:43-51.  
Shih, D. J., et al.
- 2014 Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. *J Clin Oncol* 32(9):886-96.  
Smith, M. J., et al.
- 2014 Germline mutations in SUFU cause Gorlin syndrome-associated childhood medulloblastoma and redefine the risk associated with PTCH1 mutations. *J Clin Oncol* 32(36):4155-61.  
Sumer-Turanligil, N. C., E. O. Cetin, and Y. Uyanikgil
- 2013 A contemporary review of molecular candidates for the development and treatment of childhood medulloblastoma. *Childs Nerv Syst* 29(3):381-8.

Taylor, M. D., et al.

2012 Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123(4):465-72.

Thompson, M. C., et al.

2006 Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol* 24(12):1924-31.

Zhukova, N., et al.

2013 Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. *J Clin Oncol* 31(23):2927-35.

Zikova, M., et al.

2014 DISP3 promotes proliferation and delays differentiation of neural progenitor cells. *FEBS Lett* 588(21):4071-7.

Zitterbart, Karel, Zdeněk Pavelka, and Jana Zitterbartová

2010 Medulloblastom: nejčastější zhoubný nádor mozku u dětí. *Onkologie* 4(4):256–259.