

mgr Anna Antonina Sobocińska

Klasyfikacja molekularna podnamiotowych guzów
mózgu o wysokim stopniu złośliwości u dzieci
w oparciu o profilowanie ekspresji wybranych genów
z zastosowaniem technologii NanoString

*Molecular classification of high grade pediatric brain
tumors based on gene expression profiling using
NanoString technology*

Rozprawa na stopień naukowy doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotorzy: dr hab. Maria Anna Łastowska, prof. IMDiK i prof. dr hab. n. med. Ewa Matyja



Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2022

„Próbowałam różnych doświadczeń opisanych w podręcznikach fizyki i chemii, a wyniki ich były czasem bardzo dobre. Niekiedy dodawał mi otuchy jakiś drobny sukces. Kiedy indziej znów wpadłam w głęboką rozpacz z powodu wypadków i błędów wynikających z mojego braku doświadczenia. Ponieważ jednak na ogół wiedziałam, że postępy nie przychodzą ani szybko, ani łatwo, te pierwsze próby utrwaliły we mnie zamiłowanie do badań eksperymentalnych na polu fizyki i chemii.”

~ Maria Skłodowska-Curie, o początkach pracy naukowo-badawczej

„Choroba jest nocną półkulą życia, naszym bardziej uciążliwym obywatelstwem. Od dnia narodzin każdy z nas posiada bowiem jakby dwa paszporty – przynależy zarówno do świata zdrowych, jak i do świata chorych. I choć wszyscy wolimy przyznawać się tylko do lepszego z tych światów, prędzej czy później, chociażby na krótko, musimy uznać również nasz związek i z tym drugim.”

~ Susan Sontag, z eseju „Choroba jako metafora”

*Chciałabym złożyć najszczerze podziękowania
Pani Profesor Marii Łastowskiej i Pani Profesor Ewie Matyji
za przekazaną wiedzę, wskazówki merytoryczne oraz możliwość rozwoju naukowego w trakcie
doktoratu realizowanego w Zakładzie Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej.*

*Wyrazy serdeczności ślę również w stronę wszystkich Pracowników Zakładu,
Koleżanek i Kolegów ze studiów i samorządów doktoranckich.*

*Moja praca doktorska nie powstałaby gdyby nie bezwarunkowe i nieustanne wsparcie moich
Rodziców, Anny Andrałójć i Wojciecha Sobocińskiego.*

*Mamo i Tato, zaufanie, jakim mnie obdarowaliście pozwoliło mi na rozwijanie swojej
dziecięcej ciekawości na studiach przez prawie 11 lat dorosłego życia.
Dziękuję Wam za ten przywilej.*

*Mojej Babci i mojemu Dziadkowi,
Ludwinie Andrałójć i Zdzisławowi Sobocińskiemu,
dziękuję za cierpliwość i zrozumienie.
Cioci Basi Bienkowskiej dziękuję za lekcje języka angielskiego.*

*Moim Przyjaciółkom i wszystkim Bliskim
dziękuję za towarzyszenie mi w tym doświadczeniu.
Wasza obecność pozwalała mi na wytchnienie i poczucie jedności w chwilach zwątpienia.*

Spis treści

Oświadczenie autorki	5
Wykaz skrótów.....	6
Streszczenie	7
Abstract	11
Innowacyjność pracy	15
1. Wstęp.....	16
1.1. Wyściółczak (<i>ependymoma</i>).....	16
1.1.1. Charakterystyka kliniczna <i>ependymoma</i>	17
1.1.2. Charakterystyka histopatologiczna <i>ependymoma</i>	18
1.1.3. Charakterystyka molekularna <i>ependymoma</i>	18
1.2. Rdzeniak (<i>medulloblastoma</i>).....	21
1.2.1. Charakterystyka kliniczna <i>medulloblastoma</i>	22
1.2.2. Charakterystyka histopatologiczna <i>medulloblastoma</i>	22
1.2.3. Charakterystyka molekularna <i>medulloblastoma</i>	23
1.3. Inne nowotwory embrionalne.....	32
1.3.1. Atypowy nowotwór potworniakowy/rabdoidny, AT/RT	32
1.3.2. Nowotwory embrionalne NOS	33
1.3.3. Prymitywny nowotwór neuroektodermalny (<i>primitive neuroectodermal tumor</i> , PNET) – zmiana leksykonu diagnostycznego i zidentyfikowanie nowych podtypów molekularnych rzadkich nowotworów ośrodkowego układu nerwowego.	33
1.4. Inne nowotwory podnamiotowe wieku dziecięcego o wysokim stopniu złośliwości	35
1.4.1. Nowotwory splotu naczyniówkowego	35
1.4.2. Glejaki wieku dziecięcego o wysokim stopniu złośliwości	36
1.5. Zintegrowana diagnoza histopatologiczno-molekularna.....	37
1.6. Nowe możliwości profilowania ekspresji genów.....	39
1.6.1. Technologia NanoString, system analizy nCounter	39
1.6.2. Dotychczasowe wykorzystanie metody NanoString w onkologii dziecięcej	40
2. Cel pracy.....	42
3. Materiał i metody	43
3.1. Przygotowanie skrawków parafinowych oraz izolacja RNA	44
3.2. Izolacja RNA.....	44
3.3. Selekcja genów markerowych dla grup molekularnych analizowanych nowotworów mózgu – badania <i>in silico</i> surowych danych mikromacierzy	45
3.3.1. I etap – selekcja surowych danych mikromacierzy	46

3.3.2.	II etap – analiza plików CEL w środowisku oprogramowania R.....	46
3.3.3.	III etap – porównanie danych literaturowych z wynikami analiz <i>in silico</i>	47
3.4.	Przeprowadzenie eksperymentu w oparciu o technologię NanoString	47
3.4.1.	Przygotowanie materiału, hybrydyzacja i procesowanie próbek	47
3.4.2.	Technologia NanoString – normalizacja wyników i metody klastrowania próbek.....	48
3.5.	Immunohistochemia	49
3.6.	Analiza statystyczna	51
3.6.1.	Analiza krzywych przeżycia.....	51
3.6.2.	Pozostałe analizy	51
4.	Wyniki	52
4.1.	Selekcja materiału nowotworowego do badań NanoString.....	52
4.2.	Selekcja genów markerowych.....	52
4.2.1.	Geny markerowe dla <i>ependymoma</i>	52
4.2.2.	Geny markerowe dla <i>medulloblastoma</i>	54
4.2.3.	Geny markerowe dla CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1	56
4.2.4.	Podsumowanie analiz	56
4.3.	Analiza ekspresji genów przy użyciu technologii NanoString.....	57
4.3.1.	<i>Ependymoma</i> podnamiotowe – ustalenie przynależności do grupy molekularnej	57
4.3.2.	<i>Medulloblastoma</i> – ustalenie przynależności do grupy molekularnej.....	60
4.3.3.	Nowotwory CNS HGNET.....	62
4.4.	Analiza immunohistochemiczna	67
4.4.1.	Barwienie immunohistochemiczne w celu wykrycia ekspresji białka ALK	67
4.4.2.	Barwienie immunohistochemiczne w celu wykrycia ekspresji białka BCOR	68
4.5.	Korelacje biologiczno-kliniczne.....	70
4.5.1.	Charakterystyka kliniczna <i>ependymoma</i>	70
4.5.2.	Charakterystyka kliniczna <i>medulloblastoma</i>	76
4.5.3.	Charakterystyka kliniczna CNS HGNET-BCOR.....	80
5.	Dyskusja	81
6.	Podsumowanie.....	91
7.	Wnioski	92
8.	Bibliografia.....	93

Oświadczenie autorki

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w następujących pracach:

1. Łastowska M, Trubicka J, Karkucińska-Więckowska A, Kaleta M, Tarasińska M, Perek-Polnik M, **Sobocińska A**, Dembowska-Bagińska B, Grajkowska W, Matyja E.
„Immunohistochemical detection of ALK protein identifies APC mutated medulloblastoma and differentiates the WNT-activated medulloblastoma from other types of posterior fossa childhood tumors”
Brain Tumor Pathology 2019 Jan;36(1):1-6. (IF = 2.13 w roku 2019)
2. Łastowska M, Trubicka J, **Sobocińska A**, Wojtaś B, Niemira M, Szałkowska A, Krętowski A, Karkucińska-Więckowska A, Kaleta M, Ejmont M, Perek-Polnik M, Dembowska-Bagińska B, Grajkowska W, Matyja E.
„Molecular identification of CNS NB-FOXR2, CNS EFT-CIC, CNS HGNET-MN1 and CNS HGNET-BCOR pediatric brain tumors using tumor-specific signature genes”
Acta Neuropathologica Communications 2020 Jul 10;8(1):105 (IF = 7.801 na lata 2020-2021)
3. Łastowska M, Matyja E, **Sobocińska A**, Wojtaś B, Niemira M, Szałkowska A, Krętowski A, Karkucińska-Więckowska A, Kaleta M, Ejmont M, Tarasińska M, Perek-Polnik M, Dembowska-Bagińska B, Pronicki M, Grajkowska W, Trubicka J.
„Transcriptional profiling of paediatric ependymomas identifies prognostically significant groups”
Journal of Pathology Clinical Research 2021 Nov;7(6):565-576. (IF = 5.021 na lata 2020-2021)

Badania, których wyniki przedstawiono w rozprawie, były finansowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki o numerze 2016/21/B/NZ2/01785.

Interdyscyplinarne studia doktoranckie zostały zrealizowane w ramach projektu Och!DOK o numerze POWR.03.02.00-00-I028/17-00 (Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój współfinansowany ze środków EFS).

Wykaz skrótów

- aCPP** – ang. *atypical choroid plexus papilloma*, atypowy brodawczak splotu naczyniówkowego
- ASCAT** – ang. *Allele-Specific Copy Number Analysis*
- AT/RT** – ang. *atypical teratoid rhabdoid tumor*, atypowy nowotwór potworniakowy/rabdoidny
- CNS** – ang. *central nervous system*, ośrodkowy układ nerwowy
- CNS EFT-CIC** – ang. *CNS Ewing sarcoma family tumor with CIC alteration*
- CNS HGNET-BCOR** – ang. *CNS high-grade neuroepithelial tumor with BCOR alteration*
- CNS HGNET-MN1** – ang. *CNS high-grade neuroepithelial tumor with MN1 alteration*
- CNS NB-FOXR2** – ang. *CNS neuroblastoma with FOXR2 activation*
- CPC** – ang. *choroid plexus carcinoma*, rak splotu naczyniówkowego
- CPP** – ang. *choroid plexus papilloma*, brodawczak splotu naczyniówkowego
- CPTs** – ang. *choroid plexus tumors*, nowotwory splotu naczyniówkowego
- CT** – ang. *computer tomography*, tomografia komputerowa
- DM** – ang. *desmoplastic medulloblastoma*, rdzeniak desmoplastyczny
- DNMB** – ang. *desmoplastic/nodular medulloblastoma*, rdzeniak desmoplastyczny/guzkowy
- DS** – ang. *Deparaffinization Solution*
- EMT** – ang. *epithelial to mesenchymal transition*, przejście nabłonkowo-mezenchymalne
- EPN** – ang. *ependymoma*, wyściółczak
- ETMR** – ang. *embryonal tumor with multilayered rosettes C19MC amplified*, guz embrionalny z wielowarstwowymi rozetami i amplifikacją C19MC
- FFPE** – ang. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*
- FISH** – ang. *Fluorescence In Situ Hybridization*
- H&E** – barwienie hematoksyliną i eozyną
- HGG** – ang. *high grade glioma*, glejak wysokiego stopnia
- LCA** – ang. *large cell/anaplastic medulloblastoma*, rdzeniak wielkokomórkowy/anaplastyczny
- MB** – ang. *medulloblastoma*, rdzeniak zarodkowy
- MBEN** – ang. *medulloblastoma with extensive nodularity*, rdzeniak z nasiloną strukturą guzkową
- MLPA** – ang. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
- MRI** – ang. *magnetic resonance imaging*, rezonans magnetyczny
- NOS** – ang. *not otherwise specified*, nieokreślone inaczej
- OS** – ang. *overall survival*, współczynnik przeżycia całkowitego
- OUN** – ośrodkowy układ nerwowy
- PFS** – ang. *progression-free survival*, współczynnik czasu przeżycia wolnego od progresji choroby
- pHGG** – ang. *pediatric high grade glioma*, pediatryczny glejak wysokiego stopnia
- PPNG** – ang. *The Polish Pediatric Neurooncology Group*, Polska Grupa ds. Neuroonkologii Dziecięcej
- qPCR** – ang. *quantitative polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
- PNET** – ang. *primitive neuroectodermal tumor*, prymitywny nowotwór neuroektodermalny
- RIN** – ang. *RNA integrity number*, współczynnik integralności RNA
- QC** – ang. *quality control*, kontrola jakości
- qRT-PCR** – ang. *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
- WHO** – ang. *World Health Organization*, Światowa Organizacja Zdrowia

Streszczenie

Wstęp: Nowotwory układu nerwowego u dzieci są drugą, co do częstości występowania, grupą nowotworów po białaczkach. Stanowią 20-25% wszystkich nowotworów wieku rozwojowego i są najczęstszą przyczyną zgonu u dzieci i młodych dorosłych. Mogą występować w każdej lokalizacji układu nerwowego, najczęściej jednak umiejscowione są podnamiotowo w tylnym dole czaszki. Głównym problemem terapeutycznym guzów o takiej lokalizacji, szczególnie w przypadku gdy naciek nowotworowy obejmuje pień mózgu, jest ograniczony dostęp w czasie zabiegu neurochirurgicznego i niepełny zasięg resekcji. Rutynowa analiza histopatologiczna nie zawsze stanowi obiektywny czynnik prognostyczny, dlatego ciągle poszukuje się lepszych metod stratyfikacji pacjentów do grup ryzyka oraz opracowywania nowych rozwiązań terapeutycznych dla pacjentów nie kwalifikujących się do standardowych protokołów.

Do niedawna kryteria rokownicze w guzach mózgu opierały się głównie na ocenie zakresu resekcji guza oraz rozpoznaniu histopatologicznym. W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój badań molekularnych guzów mózgu, co znalazło odzwierciedlenie w nowej klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia z 2021 roku. Profilowanie genetyczne i epigenetyczne nowotworów mózgu zmieniło ich diagnostykę, wprowadzając nowe podgrupy molekularne i zmieniając nazwy niektórych typów guzów. Jednak większość technik biologii molekularnej, stosowanych w pracach badawczych, wymaga wysokiej jakości i integralności RNA, co nie jest możliwe do uzyskania w przypadku materiału rutynowo utrwalonego w formalinie i zatopionego w parafinie (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, FFPE), dostępnego w pracowniach patomorfologicznych. Dlatego w niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę klasyfikacji guzów mózgu o wysokim stopniu złośliwości u dzieci w oparciu o analizę poziomu ekspresji genów przy pomocy technologii NanoString, która umożliwia wykorzystanie zdegradowanego RNA.

Cel pracy: Podstawowym celem pracy doktorskiej była klasyfikacja molekularna guzów mózgu o wysokim stopniu złośliwości u dzieci. Badania dotyczyły zaprojektowania i przetestowania sygnatury ekspresyjnej genów markerowych, specyficznych dla poszczególnych grup molekularnych w wybranych guzach podnamiotowych. Nowotwory te charakteryzują się złą prognozą dla pacjenta, dlatego stanowią duże wyzwanie dla neuropatologów i onkologów dziecięcych.

Przedmiotem badań było również ustalenie korelacji biologiczno-klinicznych w badanych nowotworach, porównanie wyników do danych literaturowych oraz ocena potencjału wykorzystania metody analizy nCounter do diagnostyki nowotworów. Uzupełnieniem badań

molekularnych była identyfikacja diagnostycznych biomarkerów immunohistochemicznych dla wybranych grup molekularnych nowotworów.

Materiały i metody: Do badań molekularnych wykorzystano archiwalne bloczki parafinowe, udostępnione w Zakładzie Patomorfologii Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie. Badaniami objęto przypadki z oryginalnym rozpoznaniem histopatologicznym rdzeniaka (*medulloblastoma*), wyściółczaka (*ependymoma*), glejaka o wysokim stopniu złośliwości (*high grade glioma*, HGG), atypowego nowotworu potworniakowo rabdoidego (*atypical teratoid rhabdoid tumor*, AT/RT), oraz raka splotu naczyniówkowego (*choroid plexus carcinoma* CPC). Materiał został wyselekcjonowany według określonych kryteriów: wiek pacjenta poniżej 18 roku życia, lokalizacja podnamiotowa oraz stopień złośliwości histopatologicznej 3 i 4 wg WHO. Do badań włączono również wyściółczaki o drugim stopniu złośliwości, ponieważ kryteria diagnostyczne pomiędzy drugim a trzecim stopniem złośliwości histopatologicznej są nieprecyzyjne, natomiast stopień złośliwości nie ma większego znaczenia klinicznego.

Wybrano 180 bloczków, które poddane zostały ocenie histopatologicznej przez dwóch niezależnych neuropatologów. W końcowej fazie weryfikacji zaakceptowano 159 próbek do przeprowadzenia izolacji RNA. Do analizy ekspresji genów za pomocą systemu analiz nCounter użyto 113 próbek RNA, które pozytywnie przeszły kontrolę jakości i ilości otrzymanego RNA.

W celu identyfikacji genów markerowych dla poszczególnych nowotworów dokonano re-analizy plików mikromacierzy ekspresyjnych, dostępnych w bazie danych Gene Expression Omnibus. Dane wprowadzono do środowiska oprogramowania R i znormalizowano metodą MAS5, używając do tego biblioteki „*affy*”. Następnie wykonano normalizację kwantylową wszystkich prób guzów podnamiotowych. Miarą dobrego kandydata na marker molekularny była średnia wartość współczynnika istotności (*p-value*) oraz tzw. średnia krotność zmiany ekspresji genów (*fold*). Losowy wybór próbek oraz stukrotne powtarzanie testu t-Studenta miało zapewnić większą stabilność wyboru genów markerowych. Nadzorowane klastrowanie wykonano przy użyciu biblioteki „*squash*” ze środowiska oprogramowania R. Analizę w środowisku oprogramowania R wykonano w ramach współpracy z bioinformatykiem z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN (dr Bartosz Wojtaś).

Następnie przeprowadzono analizę ekspresji genów markerowych na 113 próbkach RNA, pozyskanych w sumie z 7 typów guzów, w tym dwóch typów guzów referencyjnych

CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1. Ocenę poziomu ekspresji dokonano przy użyciu systemu analiz nCounter w technologii NanoString. Etapy hybrydyzacji, detekcji i skanowania wykonano zgodnie z instrukcjami producenta w ramach współpracy z Centrum Badań Klinicznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Przy użyciu oprogramowania nSolver przeprowadzono normalizację danych, a następnie wykonano hierarchiczną analizę skupień z zastosowaniem miary odległości euklidesowej i przy użyciu metody średnich połączeń.

Korelacje biologiczno-kliniczne przeprowadzono za pomocą programów GraphPad Prism 9 i IBM SPSS Statistics 26. Ponadto, wykonano analizę immunohistochemiczną w celu sprawdzenia obecności ekspresji białka ALK i BCOR.

Wyniki: Zidentyfikowano geny markerowe dla 4 grup nowotworów podnamiotowych o wysokim stopniu złośliwości u dzieci: wyściółczaka (*ependymoma*), rdzeniaka (*medulloblastoma*), glejaków o wysokim stopniu złośliwości (*high grade gliomas*) oraz nowych, niedawno opisanych, podtypów guzów neuroepitelialnych - CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1. Ponadto przy użyciu hierarchicznej analizy skupień wyróżniono poszczególne grupy molekularne i potwierdzono użyteczność unikalnych ekspresyjnych sygnatur genowych dla grup PFA i PFB oraz podgrup PFA1 i PFA2 wyściółczaka, grup WNT, SHH oraz Grupy 3 i Grupy 4 rdzeniaka, a także nowotworu CNS HGNET-BCOR.

W kolejnym etapie wykonano hierarchiczną analizę skupień dla 91 podnamiotowych guzów mózgu oraz dwóch guzów referencyjnych dla CNS HGNET-BCOR i jednego dla CNS HGNET-MN1. W wyniku analizy, oprócz guzów referencyjnych, zidentyfikowano dwa nowe przypadki guzów wykazujące profil ekspresji genów CNS HGNET-BCOR. Pierwszy guz został pierwotnie rozpoznany jako *medulloblastoma*, a drugi jako glejak o wysokim stopniu złośliwości. Oba przypadki CNS HGNET-BCOR wykazały odmienną charakterystykę kliniczną, w tym wiek w czasie diagnozy, płeć pacjenta, lokalizację guza oraz obecność wznowy nowotworu. Różnice te mogą wskazywać na kliniczną heterogenność tego typu guzów. Nie zidentyfikowano natomiast żadnego nowego guza wykazującego profil ekspresji genów CNS HGNET-MN1, co może potwierdzać rzadkość występowania tego typu nowotworu w lokalizacji podnamiotowej.

Opierając się na wynikach analiz ekspresji genów wykonano barwienia immunohistochemiczne w celu identyfikacji białek ALK i BCOR, jako potencjalnych biomarkerów immunohistochemicznych w przypadku *medulloblastoma* i CNS HGNET-BCOR. Analiza wykazała obecność ekspresji białka ALK w >50% komórek w *medulloblastoma* grupy

transkrypcyjnej WNT. Obydwa guzy zaklasyfikowane jako CNS HGNET-BCOR w trakcie analizy ekspresji genów wykazały pozytywną ekspresję białka BCOR w jądrze komórkowym.

Analiza korelacji biologiczno-klinicznych w *ependymoma* wykazała, że znamienne różnice pomiędzy grupami molekularnymi PFA i PFB dotyczyły wieku w czasie diagnozy (8,3 lata dla PFB vs. 3,6 lat dla PFA) oraz czasu przeżycia pacjentów. W grupie molekularnej PFB wszyscy pacjenci żyją, w przeciwieństwie do pacjentów z grupy molekularnej PFA (mediana dla całkowitego przeżycia wynosi 78 miesięcy, a dla przeżycia wolnego od progresji choroby 44 miesiące).

Analizy krzywych przeżycia w grupie pacjentów z rozpoznaniem *medulloblastoma* nie wykazały znamiennych różnic pomiędzy czterema zidentyfikowanymi grupami molekularnymi. Jednakże pacjenci z grupy transkrypcyjnej WNT wyróżniali się wysoką przeżywalnością, która sięgała do 193 miesięcy od rozpoznania, przy czym w analizowanej grupie WNT nie zanotowano zgonu ani jednego pacjenta. Ponadto pacjenci z tej grupy odznaczali się najwyższą średnią wieku diagnozy, wynoszącą 12,3 lat, w przeciwieństwie do pacjentów z grupy SHH, charakteryzującą się najniższym wiekiem diagnozy wynoszącym 5,1 lat. Obserwacje te są zgodne z poprzednio opublikowanymi wynikami analiz klinicznych dla grup molekularnych *medulloblastoma*.

Podsumowanie: Uzyskane wyniki potwierdzają, że ustalenie unikalnej sygnatury genów markerowych dla *medulloblastoma*, *ependymoma*, CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1 oraz profilowanie ekspresji RNA z blozków parafinowych za pomocą analizy nCounter jest użyteczną techniką, pozwalającą na rozróżnienie grup molekularnych guzów mózgu u dzieci. Stosując tą technikę zidentyfikowano poszczególne grupy *ependymoma* i *medulloblastoma*, oraz ustalono przynależność dwóch nowotworów do grupy CNS HGNET-BCOR. Po wykonaniu analiz ekspresji genów przeprowadzono korelacje biologiczno-kliniczne i udowodniono, że przynależność do grupy molekularnej w przypadkach wyściółczaka koreluje z czynnikami klinicznymi, w tym z przeżyciem pacjentów. Wyniki analiz immunohistochemicznych wskazują, że w przypadku rdzeniaka grupy transkrypcyjnej WNT potencjalnym markerem diagnostycznym może być ekspresja białka ALK, natomiast w przypadku CNS HGNET-BCOR ekspresja białka BCOR.

Abstract

Introduction: Brain tumors in children are the second most common group of tumors after the leukemias. They represent 20-25% of all pediatric tumors and are still a leading cause of death in this age group. Central nervous system tumors in children can occur in all anatomical localization, although the most common is the *posterior fossa* region. The main therapeutic problem with tumors localized in the infratentorial region, especially in the case of brainstem tumors with diffuse growth pattern, are limited access to tumor site and thus inability to perform complete resection. Routine histopathological analysis is not always an objective prognostic factor, therefore there is a need for more reliable methods that can successfully stratify patients to risk groups, as well as for novel therapeutic approaches for patients that don't meet the standard criteria for treatment.

Until recently, prognostic criteria in brain tumors were based on extension of surgical resection of the tumor and histopathological assessment. In recent years there has been remarkable progress in molecular analysis of brain tumors, which resulted in the actualization of WHO classification in 2021. Genetic and epigenetic profiling of brain tumors had an impact on diagnosis, introducing new molecular subgroups and a novel category of tumors. Nevertheless, most of the molecular biology techniques used in research require a high level quality and integrity of RNA, which is not obtainable in the case of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) material, routinely used and available in pathomorphological laboratories. Therefore, this dissertation is focused on an attempt to classify high grade brain tumors in children based on gene expression analysis performed by NanoString technology that allows working with degraded RNA.

Objectives: The main objective of this dissertation was a molecular classification of high grade, infratentorial brain tumors in children. Analyses involved designing and testing of the unique marker gene signatures, specific for molecular types of selected infratentorial tumors, which are characterized by poor prognosis for patients, therefore presenting a great challenge for neuropathologists and pediatric oncologists.

Moreover, the further objectives are establishment of biological and clinical correlations in analyzed tumors, comparison of the results to current literature data and an assessment of the utility of nCounter Analysis System for tumor diagnosis. An additional goal was to identify immunohistochemical markers for selected molecular groups of analyzed brain tumors.

Material and methods: The material consists of FFPE samples of tumors collected in an archive of the Pathomorphology Department, The Children's Memorial Health Institute in Warsaw. It included tumors with a diagnosis of medulloblastoma, ependymoma, high grade glioma (HGG), atypical teratoid rhabdoid tumor (AT/RT) and choroid plexus carcinoma (CPC). Material was selected with the following, specific criteria: <18 years old at diagnosis, infratentorial localization and 3 or 4 grade according to WHO. In case of ependymoma, grade 2 tumors were added because of recent results indicating that grade 2 and 3 distinction in case of ependymoma does not bring prognostic value, thus making it impossible to assess its clinical outcome. Overall, 180 FFPE blocks were chosen for a histopathological examination performed by two independent neuropathologists. Out of the initial 180 sample blocks, 159 were accepted for RNA isolation. After passing the quality and quantity control, 113 samples were finally selected for gene expression analysis by the nCounter Analysis System.

To select new marker candidates for all pediatric brain tumors that were chosen for gene expression analysis, reanalysis of microarray CEL files from Gene Expression Omnibus was performed. Files were uploaded to the R environment, normalized with MAS5 method using the "affy" library. In the next steps, quantile normalization was performed on CEL files corresponding to infratentorial tumors. Mean p-value and mean fold change from 100 t-tests were used as measures of good marker candidate. Random selection of samples and repeating t-test 100 times was done to assure marker selection robustness. Unsupervised as well as supervised clustering was done using the "squash" R library. Analysis in the R environment was performed in collaboration with bioinformatician dr Bartosz Wojtaś from the Nencki Institute Of Experimental Biology PAS.

Next, marker gene expression analysis was performed on 113 RNA samples from 7 types of tumors, including two reference tumors HGNET-BCOR and CNS HGNET-MN1. Gene expression assessment was performed with the nCounter Analysis System in the NanoString technology. Hybridization of probes to tumor RNA samples, detection and scanning were conducted in the Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, Poland, according to the NanoString Technologies procedures. Normalization of raw data and hierarchical analysis were executed in the nSolver environment using Euclidean distance and average linkage.

Biological and clinical correlations were performed using GraphPad Prism 9 and IBM SPSS Statistics 26. Immunohistochemistry for ALK and BCOR protein expression was also performed on FFPE slides in selected tumor samples.

Results: Marker gene candidates were identified for the four groups of infratentorial high grade tumors: ependymoma, medulloblastoma and high grade glioma, as well as for the newly discovered neuroepithelial group of tumors, CNS HGNET-BCOR and CNS HGNET-MN1. Hierarchical analysis of tumors identified samples based on their molecular groups and demonstrated the effectiveness of the unique gene signatures for PFA and PFB groups and PFA1 and PFA2 subgroups in ependymoma, four molecular groups in medulloblastoma – WNT, SHH, Group 3 and Group 4.

In the next step, hierarchical clustering of 91 infratentorial tumors, as well as two CNS HGNET-BCOR reference samples and one CNS HGNET-MN1 reference sample, was performed. In consequence, except the reference samples, two new tumors showed profiles of CNS HGNET-BCOR gene expression signatures. One tumor was originally diagnosed as medulloblastoma, and the second one as high grade glioma. Both cases of CNS HGNET-BCORs displayed diverse clinical characteristics, including age at diagnosis, gender, tumor location and relapse. The differences may indicate clinical heterogeneity for these types of tumors. By contrast, no CNS HGNET-MN1 tumor was identified, which suggests a very rare appearance of this type of tumor in the infratentorial region.

Based on the results of analyses from the previous steps, immunohistochemical staining was performed for identification of ALK and BCOR protein expression, as potential immunohistochemical markers for medulloblastoma and CNS HGNET-BCOR. In effect, analysis showed expression of ALK protein in over 50% of tumor cells in WNT-activated medulloblastomas. Both tumors classified as CNS HGNET-BCOR type showed nuclear expression of BCOR protein.

Analysis of biological and clinical correlations of ependymoma cases showed significant differences between the age of diagnosis in molecular groups (8,3 years for PFB group vs. 3,6 years for PFA) and survival rates of patients. In PFB group all patients are alive, contrary to PFA group, where median for overall survival is 78 months and median for progression-free survival is 44 months.

Kaplan-Meier survival analysis in medulloblastoma showed no correlation between molecular group and survival of patients. However, patients from molecular group WNT had the longest survival that ranged up to 193 months since diagnosis and there were no deaths in this particular group of patients. In addition, they had the highest average age at diagnosis (12,3 years), in

contrast to SHH medulloblastoma patients with the lowest onset of the disease at 5,1 years of age.

Summary: Results of the dissertation confirm that establishing the unique gene signatures for medulloblastoma, ependymoma, CNS HGNET-BCOR and CNS-HGNET-MN1 tumors, as well as RNA expression profiling of FFPE blocks using the nCounter Analysis System, is an useful technique that allows for identification of molecular groups in pediatric brain tumors. This approach allowed for ependymoma and medulloblastoma molecular group identification and detection of two CNS HGNET-BCOR tumors. After accomplishment of gene expression analysis, biological and clinical correlations were established and the results demonstrated that in ependymoma patients molecular group correlates with clinical features, including rates of survival. The results of immunohistochemical analyses imply that in the case of WNT medulloblastoma, the ALK protein expression may serve as a potential diagnostic marker, whereas, the BCOR protein expression may serve as a surrogate marker for CNS HGNET-BCOR tumors.

Innowacyjność pracy

Metody multiomiczne (*multiomics*), do których zalicza się również metody oparte na technologii NanoString, wyznaczają nowe trendy badań w onkologii. Coraz częściej badania nad nowotworami przyjmują formę długoletnich analiz, prowadzonych przez wieloosobowe zespoły badawcze. Zastosowanie zaawansowanych technik genomicznych, proteomicznych, epigenetycznych, czy metabolomicznych wymaga ponoszenia wysokich kosztów. Badacze winni zatem wykorzystywać ogólnodostępne bazy danych do tworzenia przyszłych projektów badawczych.

W prezentowanych obecnie badaniach wykorzystano unikalny materiał archiwalny Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, przy czym do selekcji genów markerowych wykorzystano metody eksploracji danych (*data mining*) i zaawansowane metody bioinformatyczne, wykonywane w środowisku oprogramowania R. Analiza bioinformatyczna wykonana została w oparciu o wyniki mikromacierzy ekspresyjnych, uzyskanych przez inne grupy badawcze, co umożliwiło selekcję kandydatów na geny markerowe. Ogólnodostępność baz danych, takich jak wspomniana w pracy baza GEO, a także artykułów naukowych, stanowi podwaliny rozwoju nowoczesnej nauki, zwłaszcza w przypadku chorób rzadkich u dzieci.

W przedstawianej pracy doktorskiej zastosowano nową metodę analizy ekspresji genów nCounter w technologii NanoString, która umożliwiła wykorzystanie materiału archiwalnego z blozków parafinowych (FFPE). Wykazano przydatność technologii NanoString do molekularnej klasyfikacji guzów i identyfikacji grup prognostycznych. Ma to istotne znaczenie nie tylko badawcze, ale także może znaleźć praktyczne zastosowanie w neuroonkologii dziecięcej i umożliwić wprowadzenie spersonalizowanych protokołów terapeutycznych. Wykazane w tej pracy sygnatury genowe dla *ependymoma*, a także opublikowane w roku 2020 sygnatury genów dla guzów CNS HGNET-BCOR, jak również CNS HGNET-MN1, były pierwszymi tego rodzaju wynikami na świecie. Wobec powyższego, metoda NanoString stwarza ogromne możliwości prowadzenia badań klinicznych opartych na biomarkerach molekularnych, które mogą uzupełnić fenotyp histologiczny o czynniki prognostyczne i/lub predykcyjne i tym samym wpływać na podejmowane decyzje kliniczne. Uzyskane wyniki potwierdzające przydatność metody NanoString mogą stanowić także wkład w realizację przyszłych badań w zakresie onkologii wieku rozwojowego, np. analizę mięsaków, przez co mogą być pomocne w ustaleniu nowej klasyfikacji molekularnej tych guzów.

1. Wstęp

W Polsce każdego roku diagnozuje się około 1200 nowych przypadków nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN) u dzieci, które stanowią aż 20% wszystkich nowotworów wieku rozwojowego. W ciągu ostatnich dwóch dekad, pomimo znacznego postępu w diagnostyce i leczeniu, rokowanie w tej grupie pacjentów jest nadal niekorzystne. Leczenie dzieci z nowotworem mózgu musi uwzględniać wrażliwość rozwijającego się mózgu na agresywną terapię, w tym poważne, odległe następstwa napromieniania. Dlatego nowe protokoły terapeutyczne wprowadzają ograniczone dawki radioterapii i wielolekową chemioterapię w celu poprawy bezpośrednich wyników leczenia i zminimalizowania niepożądanych efektów długoterminowych.

Nowotwory OUN u dzieci mogą występować w każdej lokalizacji układu nerwowego, najczęściej jednak umiejscowione są podnamiotowo. Pierwotne guzy tylnego dołu czaszki stanowią ponad 55% wszystkich nowotworów OUN wieku rozwojowego. To znacząca różnica w stosunku do osób dorosłych, u których większość pierwotnych nowotworów mózgu zlokalizowana jest nadnamiotowo w półkulach, natomiast w przestrzeni podnamiotowej występują głównie przerzuty nowotworów z innych narządów.

Przedmiotem obecnie przeprowadzonych badań molekularnych były wybrane podnamiotowe guzy wieku dziecięcego o wysokim stopniu złośliwości, charakteryzujące się złą prognozą kliniczną i dużą śmiertelnością, co stanowi szczególne wyzwanie dla neuropatologów i onkologów dziecięcych.

Badaniami objęto przypadki z rozpoznaniem rdzeniaka (*medulloblastoma*), wyściółczaka (*ependymoma*), atypowego nowotworu potworniakowo/rabdoidnego (*atypical teratoid rhabdoid tumor*, AT/RT), raka splotu naczyniówkowego (*choroid plexus carcinoma*, CPC) oraz glejaka o wysokim stopniu złośliwości (*high grade glioma*, HGG) [1].

1.1. Wyściółczak (*ependymoma*)

Wyściółczaki stanowią heterogenną grupę nowotworów OUN, występującą u pacjentów w różnym wieku. Są to nowotwory pochodzenia glejowego, wywodzące się z gleju wyściółkowego, który pokrywa światło komór mózgu i kanał centralny rdzenia kręgowego. Występują najczęściej u dzieci i młodych dorosłych poniżej 20 roku życia, znacznie rzadziej w populacji osób dorosłych. U dzieci są trzecią, co do częstości występowania, grupą nowotworów neuroepitelialnych OUN i stanowią 30% nowotworów wewnątrzczaszkowych

poniżej trzeciego roku życia. Wyściółczaki wieku dziecięcego najczęściej zlokalizowane są wewnątrzczaszkowo (90%), z czego 2/3 występuje w tylnym dole czaszki, a 1/3 nadnamiotowo.

1.1.1. Charakterystyka kliniczna *ependymoma*

Wyściółczaki podnamiotowe, rozwijające się w tylnej jamie czaszki, powodują wzrost ciśnienia śródczaszkowego i związane z nim objawy, takie jak ból głowy, nudności i wymioty. Guzy IV komory są przyczyną wodogłowia i powodują szybkie pogorszenie stanu ogólnego pacjenta. Natomiast w guzach rdzenia kręgowego obserwujemy osłabienie siły mięśni kończyn lub zaburzenia czucia. U około 10% pacjentów już w momencie stawiania rozpoznania *ependymoma* stwierdza się rozsiew nowotworu drogą płynu mózgowo-rdzeniowego i przerzuty do rdzenia kręgowego lub mózgu.

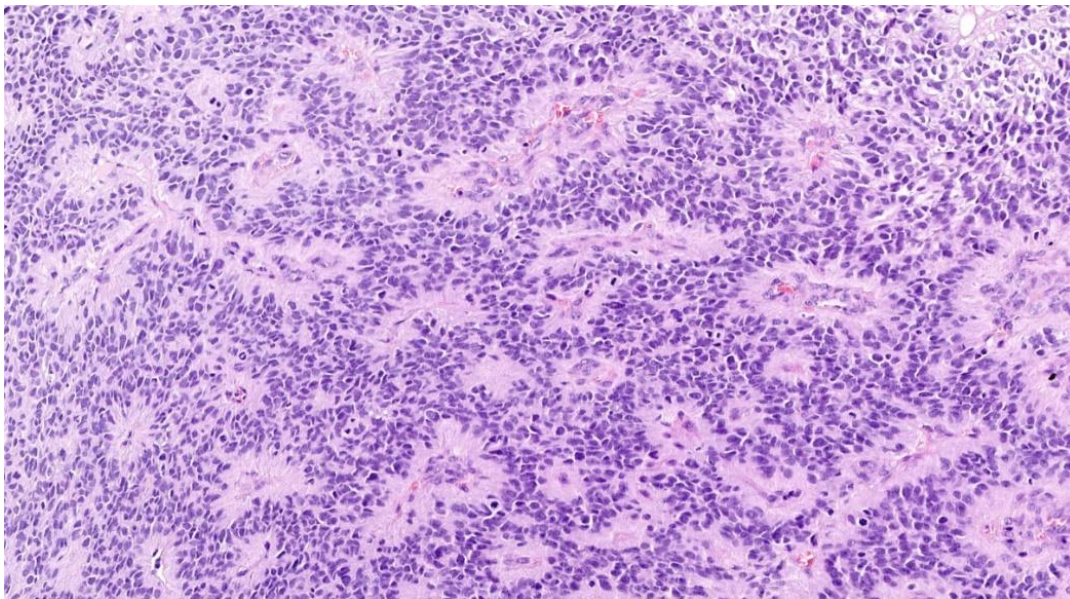
Protokoły terapeutyczne dla pacjentów wieku rozwojowego z *ependymoma* mogą różnić się w zależności od ośrodka terapeutycznego. Podstawową formą leczenia u dzieci i osób dorosłych jest zabieg chirurgiczny i uzupełniająca radioterapia. Rozległość operacji zależy od wielkości guza, jego lokalizacji i wieku pacjenta. Zakres resekcji guza i wiek pacjenta uważane są za dwa podstawowe czynniki prognostyczne. Radykalny zabieg chirurgiczny wiąże się z lepszym całkowitym przeżyciem niezależnie od wieku pacjenta, dlatego ważnym etapem leczenia jest usunięcie jak największej masy guza. Całkowita resekcja możliwa jest jednak tylko w 50% przypadków [2]. U dzieci, u których przeprowadzono całkowitą resekcję guza, 5-letni współczynnik przeżycia wynosi 72,7% [3]. Współczynnik 5-letniego przeżycia obniża się w przypadku częściowej resekcji i wynosi 37,2% [4]. Do niedawna nawrót choroby wiązał się z wysokim odsetkiem śmiertelności. Obecnie standardowe postępowanie przy wznowie obejmuje reoperację i miejscowe napromieniowanie. Stosowanie chemioterapii w przypadku pacjentów poddanych całkowitej resekcji i radioterapii jest ciągle dyskutowane, jednak chemioterapia neoadjuwantowa stosowana jest w przypadku pacjentów z nawrotem choroby i u niemowląt w celu zmniejszenia masy guza przed operacją. W przypadku niemowląt pozwala to na przeprowadzenie bezpieczniejszego zabiegu chirurgicznego i odroczenie radioterapii.

W odniesieniu do pacjentów z nawrotem choroby prowadzone są badania kliniczne efektywności nowych leków, takich jak Erlotinib i Etopozyd (badanie kliniczne nr NCT01032070), Bewacyzumab i Lapatynib (badanie kliniczne nr NCT0088368) oraz kombinacji różnych strategii terapeutycznych i leków biologicznych, takich jak AdV-tk, Valacyclovir (badanie kliniczne nr NCT0063423). Niemniej w ostatnich latach nie zaobserwowano istotnej poprawy w zakresie rokowania i współczynnik umieralności

pacjentów pozostaje wysoki. Nadal trwają więc poszukiwania bardziej precyzyjnych czynników prognostycznych oraz nowych strategii terapeutycznych dla tej grupy pacjentów [5-7].

1.1.2. Charakterystyka histopatologiczna *ependymoma*

Cechą charakterystyczną wyściółczaka jest monomorficzne utkanie nowotworowe, złożone z komórek przypominających komórki wyściółki (Rycina 1). W obrębie utkania obecne są pseudorozetowate układy okołonaczyniowe komórek nowotworowych - tzw. pseudorozety, rzadziej prawdziwe rozety wyściółkowe oraz struktury przypominające kanał centralny rdzenia kręgowego. Kryteria histopatologiczne określające drugi trzeci stopień złośliwości są nieprecyzyjne i nie dostarczają najbardziej istotnych dla klinicystów danych prognostycznych. Ocena stopnia złośliwości nie wystarcza do stratyfikacji pacjenta do odpowiedniej grupy ryzyka i tym samym nie stanowi podstawy do ustalenia planu leczenia. Stąd wynika konieczność identyfikacji określonej grupy molekularnej dla danego rodzaju nowotworu.



Rycina 1. Obraz histopatologiczny *ependymoma*. W obrębie monomorficznego utkania nowotworu widoczne liczne pseudorozety okołonaczyniowe.

1.1.3. Charakterystyka molekularna *ependymoma*

Pierwsze badania genetyczne *ependymoma* ujawniły, że nowotwory te posiadają różne aberracje, z których najczęstszą jest monosomia lub translokacja $t(1;22)(p22;q11.2)$ w obrębie chromosomu 22 [8, 9]. Natomiast duplikacja długiego ramienia chromosomu 1 występuje z największą częstotliwością u dzieci i wiąże się z gorszym rokowaniem [10]. Przełomem w charakterystyce biologicznej *ependymoma* było zastosowanie nowych metod badawczych,

ukazujących różne profile ekspresji RNA w analizowanych guzach. Wyniki analizy z użyciem mikromacierzy pozwoliły na podział *ependymoma* na 9 grup o odmiennych profilach molekularnych [11]. Wykazano wtedy, że guzy wewnątrzczaszkowe, oznaczone umownie literami od A do I, znacząco różnią się od wyściółczaków rdzenia kręgowego (E, F). Dodatkowo udokumentowano różne podłoże molekularne nowotworów nadnamiotowych (A – D) i podnamiotowych (G – I). Guzy zlokalizowane w rejonie nadnamiotowym wykazywały częste delecje w obrębie chromosomu 3, 9 i 22. W przypadku guzów podnamiotowych w połowie przypadków stwierdzono brak aberracji chromosomowych genomu, a w pozostałych przypadkach wykazano delecje w obrębie ramienia 6q w grupie H. Badania te oparte były na niewielkiej grupie badawczej (83 guzów), jednak odkrycie heterogenności molekularnej wyściółczaków potwierdzono ponownie rok później na większej liczbie przypadków (177 guzów) z dwóch ośrodków badawczych. Praca ta wykazała różnice w profilach ekspresji genów nowotworów podnamiotowych i ich korelacji z czynnikami klinicznymi, takimi jak wiek pacjenta i przebieg choroby [12].

Na podstawie wszystkich uzyskanych wyników, w roku 2015 *ependymoma* podzielono na trzy podstawowe grupy molekularne, charakteryzujące się różnym profilem ekspresji genów i różną lokalizacją w OUN: wyściółczaki nadnamiotowe (*supratentorial* - ST), podnamiotowe (*posterior fossa/infratentorial* - PF) i zlokalizowane w kanale kręgowym (*spinal cord* – SP) [13].

Kolejne badania oparte o analizę profilu metylacji DNA całego genomu w poszczególnych guzach, potwierdziły występowanie trzech odmiennych grup guzów o różnym przebiegu choroby i rokowaniu [14]. Już w klasyfikacji WHO z 2016 roku w przypadku *ependymoma* zwracano uwagę na brak jasnych czynników prognostycznych i stratyfikacji pacjentów do grup ryzyka. Wyróżniono wtedy po raz pierwszy grupę wyściółczaków nadnamiotowych z obecnością genu fuzyjnego *C11orf95-RELA* – *ependymoma RELA fusion-positive*, do której należy większość wyściółczaków wieku dziecięcego o drugim i trzecim stopniu złośliwości histologicznej.

W związku z wprowadzaniem danych molekularnych do zintegrowanej diagnostyki nowotworów OUN, szczególnie w odniesieniu do glejaków, zaistniała konieczność dalszych badań nad podłożem molekularnym również w przypadku nowotworów pochodzenia wyściółkowego.

Według najnowszej klasyfikacji guzów układu nerwowego WHO CNS2021, wyściółczaki należy klasyfikować według lokalizacji anatomicznej oraz zmian molekularnych [1].

Wśród nowotworów pochodzenia wyściółkowego wyróżnimy:

- wyściółczaki nadnamiotowe (*supratentorial ependymomas*, ST), WHO G2/3, w tym
 - *Supratentorial ependymoma, ZFTA fusion-positive*, (poprzednio znane jako *RELA fusion-positive* lub *C11orf95 fusion-positive*),
 - *Supratentorial ependymoma, YAP1 fusion-positive*,
- wyściółczaki podnamiotowe (*posterior fossa ependymoma*, PF), WHO G2/3, w tym
 - *Posterior fossa A*,
 - *Posterior fossa B*,
- wyściółczaki rdzenia (*spinal ependymoma MYCN-amplified*), WHO G2/3,
- wyściółczaki śluzowobrodawkowate (*myxopapillary ependymoma*), WHO G2,
- podwyściółczaki (*subependymoma*), WHO G1.

Podstawą do rozróżnienia odrębnych grup wyściółczaków podnamiotowych była praca Witt i wsp. opublikowana w 2011 roku [12], która przedstawiała profile ekspresji genów i ich korelację z czynnikami klinicznymi. Analiza ta pozwoliła na wydzielenie dwóch głównych grup o różnej charakterystyce genetycznej. W obrębie obu grup występują nowotwory drugiego i trzeciego stopnia złośliwości histologicznej wg WHO.

Grupa A (*posterior fossa A*, PFA) stanowi większość przypadków wyściółczaków podnamiotowych. Nowotwory te występują najczęściej u dzieci i posiadają niewiele aberracji chromosomowych. Charakteryzują się one złą prognozą kliniczną, z całkowitym 10-letnim przeżyciem na poziomie 56%. *Ependymoma* tej grupy najczęściej zlokalizowane są bocznie w kącie mostowo-mózdkowym, co utrudnia ich całkowitą resekcję i często prowadzi do wznowy. Pacjenci z wyściółczakiem grupy PFA stanowią duże wyzwanie dla klinicystów, a rozpoznanie PFA niesie ze sobą wysokie ryzyko nawrotu choroby i zgonu [13]. Najnowsze doniesienia sugerują wyodrębnienie dodatkowych podgrup molekularnych PFA1 i PFA2 w obrębie grupy PFA. Ponadto wykazano, że wysoka ekspresja genu *OTX* może być markerem molekularnym dla kolejnej podgrupy pacjentów PFA2c o bardzo dobrej prognozie [15].

Grupa B (*posterior fossa B*, PFB) charakteryzuje się obecnością licznych zmian chromosomowych. Rokowanie w tej grupie pacjentów jest bardzo dobre i całkowite 10-letnie przeżycie sięga 90%. Do grupy B należą przypadki wyściółczaków u dzieci powyżej 3 roku życia i u młodych dorosłych. Ponieważ aż 50% pacjentów zostaje wyleczonych po zabiegu

chirurgicznym, zaleca się modyfikację protokołu leczniczego i zrezygnowanie z agresywnej radioterapii, powodującej poważne efekty uboczne. Wobec powyższego, identyfikacja markerów diagnostycznych dla wymienionych grup należy do priorytetowych wyzwań współczesnej onkologii dziecięcej.

Wśród genów ulegających wysokiej ekspresji w dwóch badanych kohortach pacjentów, znalazł się gen *LAMA2* dla grupy PFA i gen *NELL2* dla grupy PFB [12]. Geny te stały się potencjalnymi genami markerowymi, umożliwiającymi rozróżnienie obu grup. W ramach tego samego badania wykonano barwienia immunohistochemiczne i sprawdzono poziom ekspresji białek *LAMA2* i *NELL2* w preparatach histopatologicznych. Ustalono, że ocena ekspresji tych białek może zostać wprowadzona jako badanie pomocnicze w identyfikacji grup molekularnych PFA i PFB. Obecność markerów *LAMA2* i *NELL2* stwierdzono jednak tylko w 80% preparatów *ependymoma*, co wskazuje, że immunoekspresja białka nie jest markerem wystarczającym do postawienia rozpoznania.

Badania oparte na profilowaniu ekspresji lub metylacji DNA nie są powszechnie dostępne, dlatego poszukiwane są nowe, bardziej przydatne markery diagnostyczne i prognostyczne specyficzne dla poszczególnych grup molekularnych, które ułatwiłyby stratyfikację pacjentów do poszczególnych grup ryzyka. Jak wspomniano, klasyfikacja molekularna wyściółczaków do grupy PFA lub PFB jest istotna ze względu na swoje implikacje kliniczne. Jednak w świetle ostatnich doniesień o występowaniu heterogenności genetycznej w obrębie grupy PFA i PFB konieczna staje się ich dalsza, szczegółowa charakterystyka molekularno-kliniczna [16, 17]. Nie wiadomo bowiem, czy identyfikacja dodatkowych podgrup w ramach grup PFA i PFB będzie miała znaczenie kliniczne, czy będzie to wyłącznie charakterystyka opisowa.

1.2. Rdzeniak (*medulloblastoma*)

Rdzeniak jest najczęstszym złośliwym nowotworem OUN u dzieci. Należy do grupy nowotworów zarodkowych (embrionalnych) o najwyższym, czwartym stopniu złośliwości histologicznej wg WHO. Zlokalizowany jest podnamiotowo w tylnym dole czaszki, najczęściej w komorze IV i robaku mózdzku. Niekiedy rozrasta się w obrębie półkul mózdzku oraz pnia mózgu i dość szybko daje rozsiew drogą płynu mózgowo-rdzeniowego do przestrzeni podpajęczynówkowej kanału kręgowego i mózgu.

Do 2016 roku klasyfikacja *medulloblastoma* oparta była wyłącznie na kryteriach histopatologicznych, jednak w kolejnych aktualizacjach do identyfikacji wprowadzono klasyfikację molekularną.

1.2.1. Charakterystyka kliniczna *medulloblastoma*

Przy stratyfikacji pacjentów do grup ryzyka brane są pod uwagę kryteria kliniczne uwzględniające wiek pacjenta, pozostałość guza po resekcji i obecności przerzutów. Ocena stopnia zaawansowania choroby i potwierdzenie przerzutów możliwe jest poprzez badanie płynu mózgowo-rdzeniowego w skali Changa oraz badanie neuroobrazowe (tomografia komputerowa – CT, i rezonans magnetyczny – MRI) mózgu i rdzenia kręgowego. Do grupy standardowego ryzyka należą pacjenci powyżej trzeciego roku życia z rozpoznaniem podtypem histologicznym rdzeniaka klasycznego lub desmoplastycznego, u których wykonano całkowitą resekcję guza lub pozostawiono jedynie resztkową masę tkanki nowotworowej poniżej 1,5cm³, bez cech rozsiewu nowotworu. Pozostali pacjenci należą do grupy wysokiego ryzyka i wymagają bardziej agresywnego podejścia terapeutycznego.

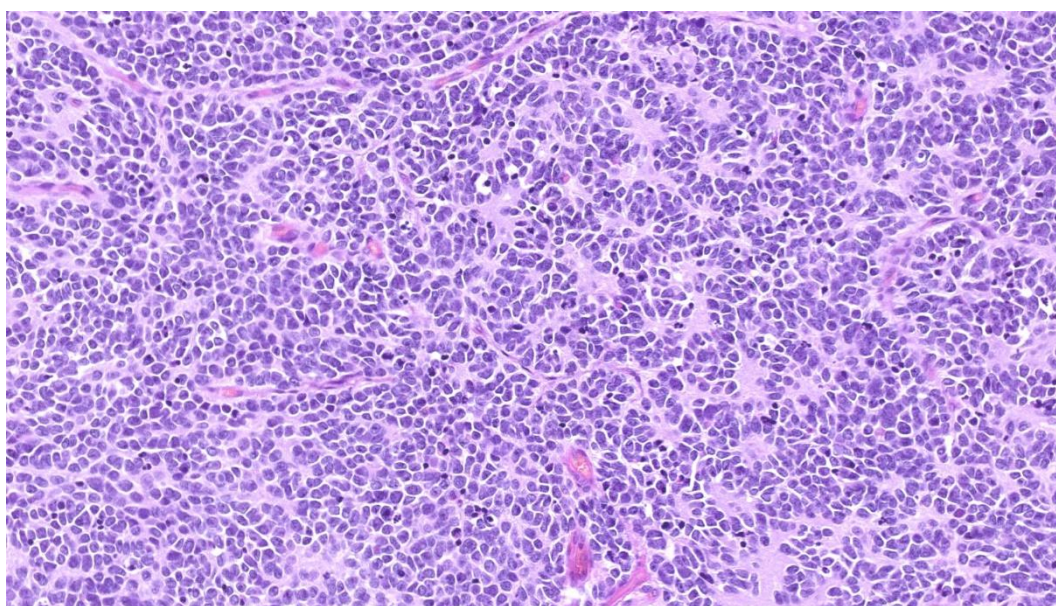
Należy jednakże podkreślić, że zarówno charakterystyka kliniczna, jak i klasyfikacja histopatologiczna nie zawsze są wystarczające do zakwalifikowania pacjentów do poszczególnych grup ryzyka, co zmusza do poszukiwania dodatkowych markerów zarówno prognostycznych, jak i diagnostycznych.

1.2.2. Charakterystyka histopatologiczna *medulloblastoma*

Rdzeniak jest nowotworem o znacznej heterogenności morfologicznej. Charakteryzuje się bogatokomórkowym utkaniem, złożonym z drobnych, niskozróżnicowanych komórek, z obecnością rozet neuroblastycznych Homera Wrighta (Rycina 2). Może wykazywać zmiany desmoplastyczne, strukturę guzkową, znaczny pleomorfizm jąder komórkowych oraz nasilone cechy anaplazji.

Według najnowszej klasyfikacji nowotworów wg WHO CNS2021 wyróżnia się cztery podtypy histopatologiczne rdzeniaka na podstawie stwierdzanego obrazu morfologicznego [1]:

- rdzeniak klasyczny (*classic medulloblastoma*),
- rdzeniak desmoplastyczny/guzkowy (*desmoplastic/nodular medulloblastoma*, DNMB),
- rdzeniak z nasiloną strukturą guzkową (*medulloblastoma with extensive nodularity*, MBEN)
- rdzeniak wielkokomórkowy/anaplastyczny (*large cell/anaplastic medulloblastoma*, LCA).



Rycina 2. Obraz histopatologiczny medulloblastoma. Widoczne liczne rozety neuroblastyczne Homera Wrighta.

Rozpoznanie ostatniego podtypu wiąże się z gorszym rokowaniem w porównaniu do pozostałych podtypów [18].

1.2.3. Charakterystyka molekularna medulloblastoma

Na początku XXI wieku gwałtowny postęp badań molekularnych umożliwił lepsze poznanie podłoża molekularnego medulloblastoma. W roku 2002, badania profilowania ekspresji genów na poziomie RNA, oparte o technikę mikromacierzy z użyciem 5920 genów, wskazały na powiązanie aktywacji szlaku sygnałowego Sonic Hedgehog (SHH) z podtypem histologicznym *desmoplastic medulloblastoma* [19]. W dwóch kolejnych pracach opublikowanych w latach 2006 i 2008 pojawiły się pierwsze próby podziału medulloblastoma pod względem profilu ekspresji genów, wyróżniające kilka klastrów, nazwanych wówczas A, B, C, D i E. Badania te potwierdziły, że rdzeniak jest nowotworem o dużej heterogenności molekularnej. Największą

uwagę poświęcono klastrom A i B, posiadającym najbardziej odmienne w stosunku do siebie profile ekspresji genów. Klaster A charakteryzował się aktywacją szlaku sygnałowego Wingless (Wnt), jak również występowaniem mutacji genu *CTNNB1* w ok. 90% guzów. Klaster B charakteryzował się zwiększoną aktywacją szlaku sygnałowego SHH, kluczowego w różnicowaniu komórek embrionalnych w czasie organogenezy i utrzymaniu homeostazy komórki [20, 21].

W 2011 roku, w oparciu o profilowanie wielogenowe dużej liczby guzów (>300) przy pomocy mikromacierzy ekspresyjnych wykazano, że *medulloblastoma* składa się z czterech podstawowych grup molekularnych: WNT, SHH, Grupy 3 i Grupy 4 [22, 23].

Badanie całego genomu na poziomie DNA przy pomocy analizy polimorfizmu pojedynczych nukleotydów ujawniło, że *medulloblastoma* posiada szereg aberracji chromosomowych, wśród których najczęściej występują delecje 6, 8, 9q, 10q, 11, 16q i 17p oraz dodatkowe kopie 1q i 7. Potwierdzono również częstą obecność izochromosomu 17q [24].

Dodatkowe badania przeprowadzone na myszach potwierdziły, że *medulloblastoma SHH-activated* wywodzi się z ziarnistych komórek prekursorowych neuronów, proliferujących we wczesnych etapach formowania mózdzku [25]. Ta sama grupa badawcza wykazała, że *medulloblastoma* grupy transkrypcyjnej WNT wywodzi się z dołu równoległobocznego i okolicy pnia mózgu, z komórek zawierających mutację genu *CTNNB1*, kodującego białko β -kateninę. Te odkrycia potwierdziły, że oba badane podtypy rdzeniaka posiadają odmienną charakterystykę pod względem lokalizacji i etiopatogenezy.

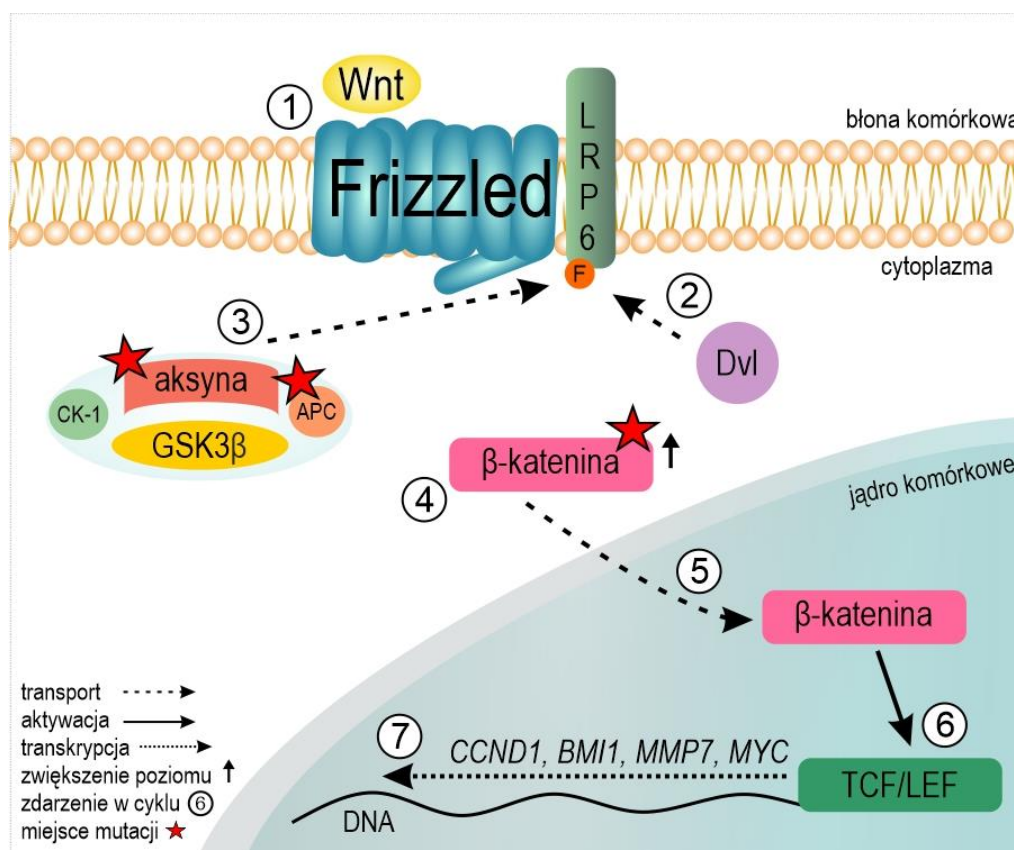
Według najnowszej klasyfikacji guzów układu nerwowego wg WHO CNS2021 [1] zostały określone cztery grupy molekularne *medulloblastoma* o odmiennej charakterystyce klinicznej i podłożu genetycznym:

- rdzeniak z grupy transkrypcyjnej WNT (*medulloblastoma, WNT-activated*),
- rdzeniak z grupy transkrypcyjnej SHH, bez mutacji *TP53* (*medulloblastoma, SHH-activated* and *TP53-wildtype*),
- rdzeniak z grupy transkrypcyjnej SHH z mutacją *TP53* (*medulloblastoma, SHH-activated* and *TP53-mutant*),
- rdzeniak nie należący do grupy transkrypcyjnej WNT i SHH (*medulloblastoma, non-WNT/non-SHH* (dawna Grupa 3 i Grupa 4).

Wypracowana dzięki licznym badaniom molekularnym nowa klasyfikacja pozwoliła na połączenie charakterystyki morfologicznej i podłoża molekularnego rdzeniaka. Przyjęte nazewnictwo związane jest przede wszystkim z nadmierną aktywacją szlaków sygnałowych Wnt oraz SHH. W związku z brakiem dobrych markerów diagnostycznych dla guzów nie wykazujących aktywności markerów dla grup transkrypcyjnych WNT i SHH, uprzednio wydzielone nowotwory Grupy 3 i Grupy 4 [26], zostały określone łącznie jako *non-WNT/non-SHH*. Wprowadzenie nowej klasyfikacji *medulloblastoma* pozwoliło na rozpoczęcie badań dotyczących korelacji pomiędzy grupami molekularnymi i parametrami klinicznymi w ramach wielośrodkowych badań klinicznych.

Grupa transkrypcyjna WNT

Aktywacja szlaku sygnałowego Wnt jest niezbędna do prawidłowej embriogenezy. W warunkach fizjologicznych szlak sygnałowy Wnt aktywowany jest poprzez związanie cząsteczki białka Wnt do receptora Frizzled. Następująca kaskada sygnałowa powoduje, że kompleks degradacyjny nadzorujący poziom β -kateniny w cytoplazmie komórki staje się nieaktywny. W efekcie zwiększa się poziom aktywnej β -kateniny w cytoplazmie i następuje transport tej cząsteczki do jądra komórki. Związanie β -kateniny z kompleksami czynników transkrypcyjnych, takich jak TCF/LEF, powoduje aktywację docelowych genów szlaku sygnałowego Wnt, m.in. genu *CCND1*, czy *MYC*. Rycina 3 przedstawia uproszczony schemat szlaku sygnałowego Wnt.



Rycina 3. Aktywacja szlaku sygnałowego Wnt. Po związaniu cząsteczki białka Wnt do receptora Frizzled (1) powstaje kompleks receptorowy Frizzled/LRP6. Rekrutacja białka Dishevelled (Dvl) powoduje fosforylację i aktywację LRP6 (2), co skutkuje dezaktywacją kompleksu degradacyjnego, złożonego z białek GSK β , APC, aksyny i CK-1 (3) i zahamowaniem fosforylacji β -kateniny. Przez brak aktywności kompleksu degradacyjnego wzrasta poziom aktywnej β -kateniny w cytoplazmie (4). Cząsteczka β -kateniny ulega przemieszczeniu do jądra komórkowego (5), gdzie wiążąc się z czynnikami transkrypcyjnymi TCF/LEF (6), wpływa na aktywację transkrypcji szeregu genów docelowych (7). Czerwonymi gwiazdkami oznaczono miejsca występowania mutacji, wpływające na nadmierną aktywację szlaku Wnt w *medulloblastoma*.

Najczęstsze mutacje w grupie transkrypcyjnej WNT występują w genie *CTNNB1*, zlokalizowanym na chromosomie 3, kodującym β -kateninę (>80%), jak również w genach *DDTX3X* i *TP53*. W związku z tym, WNT-activated *medulloblastoma* identyfikowany jest na podstawie wykrycia mutacji genu *CTNNB1*, udokumentowania ekspresji białka dla β -kateniny w jądrze komórkowym w badaniach immunohistochemicznych lub wykrycia monosomii chromosomu 6 za pomocą metody MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) lub FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*). Dodatkowym markerem diagnostycznym grupy WNT jest białko ALK, którego obecność nie została wykazana w innych przypadkach nowotworów podnamiotowych wieku dziecięcego [27].

Grupa transkrypcyjna WNT stanowi najmniej liczną grupę molekularną (~10%) i w większości przypadków koreluje z klasycznym podtypem histopatologicznym *medulloblastoma* [28]. Co istotne, wykazano, że pacjenci należący do grupy WNT posiadają największe szanse na

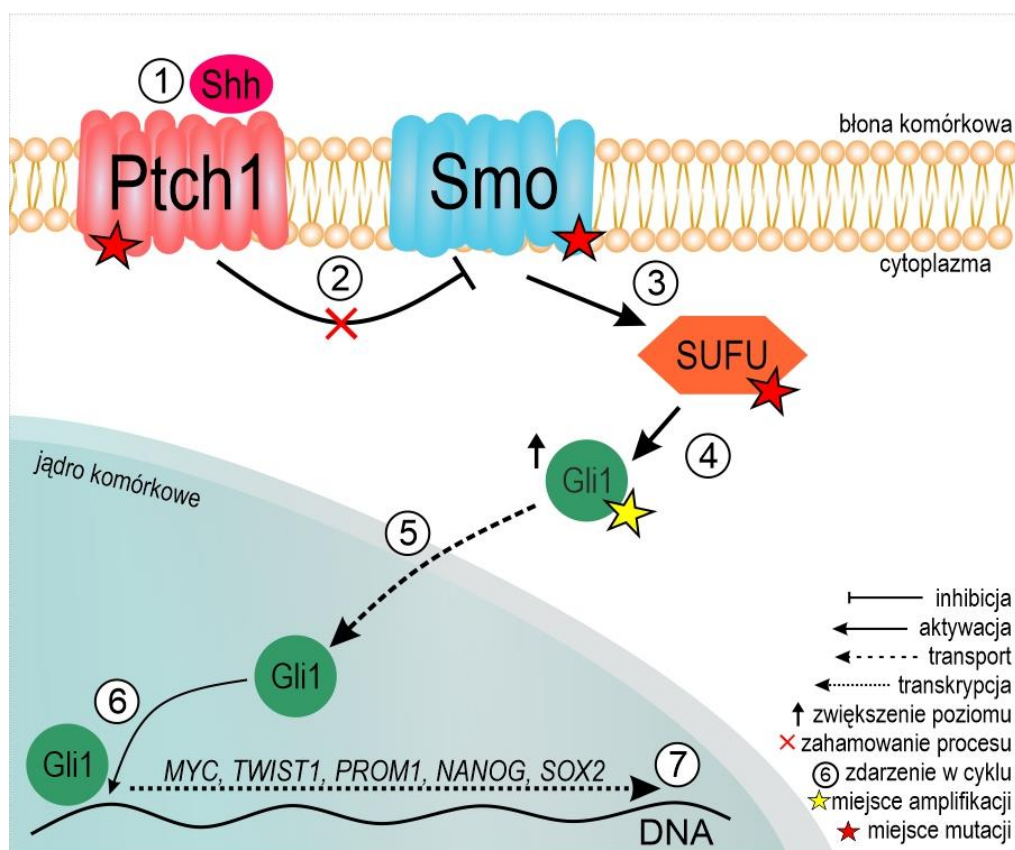
przeżycie, sięgające do 90%. Skłoniło to do modyfikacji strategii terapeutycznych w przypadku tej grupy pacjentów.

W odniesieniu do chorych należących do grupy średniego ryzyka, z całkowicie usuniętym guzem bez rozsiewu i przerzutów, rozważa się obniżenie dawek radioterapii. Ma to istotne znaczenie, gdyż radioterapia, oprócz działania niszczącego tkankę nowotworu, powoduje szereg efektów ubocznych, szczególnie niekorzystnych w przypadku pacjentów pediatrycznych. Należą do nich zaburzenia funkcji poznawczych, zaburzenia pamięci oraz udary niedokrwienne, związane z uszkodzeniem naczyń krwionośnych [29, 30]. Zmniejszenie dawki radioterapii u pacjentów z rozpoznaniem rdzeniakiem grupy WNT powinno mieć pozytywny wpływ na stan ogólny pacjenta, jego rozwój intelektualny oraz funkcje kognitywne.

Grupa transkrypcyjna SHH

Okolo 30% przypadków *medulloblastoma* należy do grupy transkrypcyjnej SHH, która w większości charakteryzuje się występowaniem podtypu histopatologicznego DNMB, znacznie rzadziej podtypu LCA. Rokowanie dla tej grupy pacjentów jest gorsze niż w przypadku *medulloblastoma* grupy WNT i współczynnik pięcioletniego całkowitego przeżycia wynosi okolo 70% [31-33]. Diagnozę *medulloblastoma SHH-activated* można postawić na podstawie obecności reakcji immunohistochemicznej przeciwko białku GAB1 i białku YAP1 [34].

Szlak sygnałowy SHH odgrywa ważną rolę w morfogenezie w okresie późnych stadiów rozwoju embrionalnego. Nadzorowany jest przez klasę białek Hedgehog, których najbardziej znanym ligandem jest Shh (*Sonic Hedgehog*). W warunkach braku tego liganda, receptor Patched reguluje pracę białka Smoothened i szlak sygnałowy pozostaje nieaktywny. Dopiero przez związanie cząsteczki białka klasy Hedgehog z receptorem Patched, inhibicja Smoothened przez Patched ulega zahamowaniu. Powoduje to możliwość aktywacji cząsteczki SUFU przez Smoothened. W rezultacie zwiększa się poziom białka Gli1 w cytoplazmie, które następnie transportowane jest do jądra komórkowego. Czynniki transkrypcyjne Gli1 wpływa na transkrypcję docelowych genów szlaku sygnałowego SHH, w tym *TWIST1*, *BM11* czy *MYC*, które odpowiedzialne są za kontrolę cyklu komórkowego, wzrost i różnicowanie komórek, a także regulację procesów, takich jak apoptoza, angiogeneza czy modyfikacje chromatyny. Schemat aktywacji szlaku sygnałowego SHH przedstawiono na Rycinie 4. Ponieważ aktywacja tego szlaku jest potencjalnym celem dla wprowadzenia kompetentnej biologicznie terapii nowej generacji, zmiany genetyczne w tej grupie guzów są opisane bardziej szczegółowo poniżej.



Rycina 4. Aktywacja szlaku sygnałowego Sonic Hedgehog (SHH). Glikoproteina Sonic Hedgehog (Shh) wiąże się z receptorem Patched (Ptch1) (1) i dezaktywuje białko Smoothened (Smo) (2). Powoduje to aktywację białka Supressor of Fused (SUFU) (3), który jest negatywnym regulatorem szlaku sygnałowego SHH, oddziałującym na czynniki transkrypcyjne z rodziny Gli. W rezultacie następuje nagromadzenie Gli1 w cytoplazmie komórki (4). Następnie Gli1 jest transportowane do jądra komórkowego (5), gdzie promuje transkrypcję genów docelowych szlaku sygnałowego SHH (6), w tym genu *TWIST1*, *NANOG* czy *MYC* (7). Gwiazdkami oznaczono potencjalne miejsca mutacji lub amplifikacji powodujące nadmierną aktywację szlaku sygnałowego SHH w *medulloblastoma*.

Do genów ulegających mutacjom w grupie molekularnej SHH zalicza się *PTCH1*, *SMO*, *SUFU*, będące składowymi szlaku sygnałowego Sonic Hedgehog, jednak udział poszczególnych komponentów w aktywacji szlaku SHH zależy od wieku pacjenta i obecności mutacji *TP53*. Amplifikacja genów, takich jak *GLI1*, *GLI2* czy *N-MYC* również powoduje rozwój *medulloblastoma* [35]. W przypadku niemowląt najczęściej obserwuje się mutacje germinalne genu *PTCH1*, występujące w dziedzicznym zespole Gorlina, jak również genu *SUFU*. Pacjenci w grupie wiekowej 3-16 lat najczęściej są nosicielami mutacji somatycznej *PTCH1* oraz czasami mutacji germinalnej lub somatycznej genu supresorowego *TP53*, występującej w dziedzicznym zespole Li-Fraumeni [36]. Dlatego dla pacjentów z rozpoznaniem rdzeniaka z grupy transkrypcyjnej SHH rekomendowane jest wykonanie badań genetycznych w celu ewentualnego wykrycia zespołów genetycznych, takich jak zespół Gorlina, czy zespół Li-Fraumeni.

Okazało się, że obecność mutacji w genie *TP53* ma również bardzo istotne znaczenie klinicznie w przypadku rdzeniaka grupy transkrypcyjnej SHH, ponieważ wiąże się ze złym rokowaniem. Badania przeprowadzone na liniach komórkowych złośliwego glejaka dowodzą, że obecność mutacji *TP53* wpływa na wrażliwość komórek na radioterapię [37] oraz mniejszą wrażliwość na chemioterapię [38]. Dlatego też, klasyfikacja WHO CNS2021 dzieli *medulloblastoma* z grupy transkrypcyjnej SHH na *TP53-mutant* i *TP53-wildtype*, które charakteryzują się odmienną prognozą. *Medulloblastoma* z grupy SHH, bez obecności mutacji w genie *TP53* odznacza się dobrą prognozą i występuje u dorosłych i dzieci poniżej trzeciego roku życia. W większości przypadków do grupy tej należą rdzeniaki o histologii DNMB, wykazujące takie zmiany genetyczne jak delecję genu *PTCH1*, mutację *SUFU*, *SMO*, *DD3X* czy *KMT2D*, amplifikację genów *MYCN* i *MYCL* oraz utratę długiego ramienia chromosomu 10. Odwrotnie jest w przypadku guzów *medulloblastoma* z grupy SHH i obecnością mutacji w genie *TP53*, które mimo rzadkości występowania (20% przypadków *medulloblastoma* grupy SHH) stanowią grupę o niewielkiej szansie na wyleczenie. Aktywacja szlaku SHH w tej grupie pacjentów może być spowodowana amplifikacją genów *GLI2* lub *SHH*.

W związku z powyższym, u pacjentów z *medulloblastoma* transkrypcyjnej SHH zastosowano lek biologiczny Vismodegib, który wcześniej został zaakceptowany w terapii zaawansowanego raka podstawnkomórkowego i jego przerzutów [39]. Cząsteczka leku wiąże się z białkiem transbłonowym Smoothened i tym samym blokuje przewodnictwo sygnałowe w szlaku SHH. Jej efektywność wykazano również w przypadkach wznowy *medulloblastoma*, co stanowiło podstawę badań klinicznych, w tym badań z udziałem pacjentów pediatrycznych i dorosłych z nawracającymi i opornymi na terapię *medulloblastoma* SHH-activated (badanie kliniczne nr NCT01239316). Ustalono, że inhibitor Smo wpływa pozytywnie na długość przeżycia wolnego od progresji choroby u dorosłych z opornym i nawracającym *medulloblastoma* grupy SHH. Korelacji takiej nie wykazano w przypadku pacjentów w grupie pediatrycznej ze względu na małą liczbę przypadków i niedostępność materiału do analiz molekularnych [40]. Zaleca się dalszą obserwację tej grupy pacjentów i monitorowanie efektów ubocznych stosowania Vismodegibu, ponieważ istnieją dowody na negatywne działanie cząsteczek inhibitorów Smoothened na rozwój układu kostnego [41]. Różnice w efektywności tej cząsteczki, jak również jej potencjalnie negatywne skutki uboczne, powodują konieczność dalszych poszukiwań związków o wysokim potencjale terapeutycznym w guzach wieku dziecięcego.

Innymi potencjalnymi lekami są inhibitory białek BET (*bromodomain and extra-terminal domain*), takie jak JQ1. Białka BET, w tym BRD4, wpływają na szlak sygnałowy SHH

regulując transkrypcję czynników GLI1 i GLI2, co może być wykorzystane w przypadku pacjentów nabywających oporności na antagonistów Smo [42]. Jednakże, nie zostały one jeszcze przebadane w grupie transkrypcyjnej SHH *medulloblastoma*. Przyszłe badania kliniczne powinny skupić się na sprawdzeniu toksyczności leku JQ1 i innych inhibitorów białek BET, zwłaszcza w świetle wyników doświadczeń przeprowadzanych na myszach chimerycznych i rybach *Danio rerio* [42, 43].

Grupa 3 (*Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH*)

Grupa 3 *medulloblastoma* stanowi około 25% wszystkich przypadków rdzeniaka u dzieci, przy czym częściej występuje u chłopców. Nowotwory tej grupy prezentują w większości klasyczny podtyp histopatologiczny, rzadziej podtyp LCA. Połowa pacjentów w momencie postawienia diagnozy posiada już ogniska przerzutów [44], dlatego też Grupę 3 charakteryzuje najgorsza prognoza (przeżywalność pacjentów na poziomie 39%-58%) w porównaniu z innymi grupami molekularnymi *medulloblastoma* [45]. Przypuszcza się, że *medulloblastoma* Grupy 3 powstaje z komórek progenitorowych warstwy okołokomorowej, bądź z komórek dołu równoległobocznego. Amplifikacja onkogenu *MYC*, występująca u około 17% pacjentów tej grupy, jest złym markerem prognostycznym i wiąże się z częstym występowaniem przerzutów. Wśród innych zmian genetycznych występuje zwiększona ekspresja genu *GABRA5*, amplifikacja genu *OTX2* i mutacja *SMARCA4*.

Ponadto w Grupie 3 *medulloblastoma* występują aberracje chromosomowe, dotyczące chromosomów 7, 16, 10, 1, 8, 18 i 12. Obecność izochromosomu 17q oraz występująca jednocześnie amplifikacja *MYC* stanowią markery złej prognozy, z pięcioletnim całkowitym przeżyciem wynoszącym zaledwie 20% [46]. Wśród aktualnie prowadzonych badań na uwagę zasługuje użycie inhibitorów białka BRD4, zaangażowanego w proces nowotworzenia w rdzeniakach z amplifikacją *MYC*. Jednym z badanych inhibitorów jest JQ1, który wykazał swoją efektywność w hamowaniu wzrostu linii komórkowej *medulloblastoma* w warunkach *in vitro*. Okazało się, że inhibitor JQ1 hamuje również proliferację guza *in vivo* [47]. Poszukiwane są także inne regulatory procesu nowotworzenia w tej grupie molekularnej, w tym szlaki sygnałowe odpowiadające za powstawanie przerzutów. Jednym ze szlaków sygnałowych zaangażowanych w tworzenie przerzutów w przypadku nowotworów Grupy 3 jest szlak NOTCH1, którego aktywacja odpowiada za uruchomienie angiogenezy oraz tzw. przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (*epithelial-mesenchymal transition, EMT*) - procesu, w którym komórka, stając się komórką mezenchymalną, zyskuje zdolność do migracji i inwazyjności. Wykazano, że tworzenie przerzutów w Grupie 3 *medulloblastoma* związane

jest z aktywacją cząsteczki BMI1, której mediatorem jest TWIST1 – element szlaku sygnałowego NOTCH1. Zatem inhibicja składowych szlaku NOTCH1 może być potencjalnie skuteczna w hamowaniu tworzenia przerzutów w Grupie 3 *medulloblastoma*. Jedną z potencjalnych cząsteczek, inhibitorów szlaku sygnałowego NOTCH1, jest przeciwciało anty-NRR1, blokujące receptor NOTCH1. Użycie tej cząsteczki u myszy z guzami Grupy 3 *medulloblastoma* powodowało zmniejszenie ilości przerzutów w rdzeniu kręgowym i wpłynęło na dłuższy czas przeżycia wolnego od progresji u tych zwierząt (PFS) [48].

Grupa 4 (*Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH*)

Guzy należące do Grupy 4 występują częściej u płci męskiej (3:1) i charakteryzują się występowaniem klasycznego podtypu histologicznego. Rokowanie dla pacjentów Grupy 4 określa się jako średnie, bądź złe w przypadku dzieci poniżej 3 roku życia nie otrzymujących radioterapii. Około 30-40% pacjentów posiada przerzuty stwierdzone już w momencie rozpoznania. Pomimo, że Grupa 4 stanowi najliczniejsze grono pacjentów, niewiele wiadomo na temat jej podłoża molekularnego gdyż dotychczas nie znaleziono onkogeny lub genu supresorowego, specyficznego dla tej grupy. W Grupie 4 występuje również izochromosom 17q, jednakże w przeciwieństwie do Grupy 3, nie stanowi on niekorzystnego czynnika prognostycznego. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o występowaniu amplifikacji *MYCN*, *CDK6* oraz duplikacji *SNCAIP*, co może być wskazówką do rozpoczęcia badań nad ich udziałem w procesie nowotworowym tej grupy guzów. Korzystnym czynnikiem prognostycznym w Grupie 4 jest obecność delekcji chromosomu 11 i dodatkowej kopii chromosomu 17 [49].

Dotychczasowe wyniki badań, porównujące grupy molekularne *medulloblastoma*, wskazują na pewne podobieństwo Grupy 3 i Grupy 4 i ich wyraźną odmienną od grup transkrypcyjnych WNT i SHH. Stąd też, od 2012, próbuje się znaleźć najważniejsze różnice oraz zidentyfikować markery prognostyczne i diagnostyczne. Sugeruje się również występowanie grupy przejściowej między Grupą 3 i Grupą 4, umownie nazwanej Grupą 3/4 [50]. Ponadto najnowsze badania DNA w oparciu o profilowanie metylacji genomu ujawniły wysoką heterogenność molekularną także w ramach Grupy 3 i Grupy 4, wykazując obecność aż 8 kolejnych podtypów molekularnych [51].

Podsumowując, *medulloblastoma* jest pierwszym nowotworem mózgu u dzieci, w którym badania molekularne ujawniły tak znaczną heterogenność molekularną. Obecnie rozpoznanie neuropatologiczne powinno uwzględniać profil molekularny guza, co ma istotne znaczenie

kliniczne i konsekwencje terapeutyczne. Metody oparte o wielogenowe profilowanie na poziomie ekspresji lub metylacji DNA są na ogół niedostępne w większości laboratoriów diagnostycznych, dlatego konieczne jest wprowadzenie nowych technik przydatnych dla rutynowej diagnostyki molekularnej guzów mózgu.

1.3. Inne nowotwory embrionalne

Klasyfikacja nowotworów zarodkowych wg WHO w kolejnych aktualizacjach przeszła znaczącą modyfikację, związaną z włączeniem informacji genetycznej do diagnostyki neuropatologicznej.

Według najnowszej klasyfikacji WHO CNS2021 do grupy tzw. innych nowotworów embrionalnych zaliczono:

- atypowy nowotwór potworniakowy/rabdoidny (*atypical teratoid/rhabdoid tumor, AT/RT*),
- nowotwór embrionalny z wielowarstwowymi rozetami (*embryonal tumor with multilayered rosettes, ETMR*),
- nowotwór OUN z tandemową duplikacją *BCOR* (*CNS tumor with BCOR internal tandem duplication*),
- nowotwór embrionalny NOS (*embryonal tumor NOS, not otherwise specified*).

1.3.1. Atypowy nowotwór potworniakowy/rabdoidny, AT/RT

Atypowy nowotwór potworniakowy/rabdoidny jest złośliwym nowotworem z grupy guzów zarodkowych OUN, diagnozowanym najczęściej u dzieci poniżej trzeciego roku życia. W obrazie histopatologicznym dominują niskozróżnicowane komórki, które w badaniach histopatologicznych i immunohistochemicznych wykazują cechy wielokierunkowego różnicowania wzdłuż linii neuroektodermalnej, nabłonkowej i mezenchymalnej.

Diagnoza AT/RT wymaga wykazania inaktywacji genu *SMARCB1*, rzadziej genu *SMARCA4*. Produktami obu genów są składowe kompleksu SWI/SNF, remodelującego chromatynę. Zmiana funkcji genu *SMARCB1* objawia się brakiem ekspresji jądrowego białka INI1, a genu *SMARCA4* brakiem ekspresji jądrowego białka BRG1, które potwierdza się badaniami immunohistochemicznymi [52]. Podobnie, jak w przypadku *medulloblastoma*, klasyfikacja na podstawie obrazu histopatologicznego ma niewielkie znaczenie prognostyczne, dlatego rozpoznanie AT/RT należy potwierdzić badaniami molekularnymi.

W oparciu o analizę mikromacierzy ekspresyjnych i profilu metylacji genów zaobserwowano heterogenność molekularną AT/RT. Dwa niezależne badania, opublikowane w niewielkim odstępie czasu wykazały, że AT/RT można podzielić na trzy grupy: AT/RT-SHH, AT/RT-TYR i AT/RT-MYC [53] wyodrębnione w pierwszym badaniu i grupy 1, 2A i 2B zidentyfikowane w drugim badaniu [54]. W przestrzeni podnamiotowej najczęściej zlokalizowane są nowotwory grupy AT/RT-TYR. Wyniki analiz Torchia i wsp. [51] wskazują, że grupa 2A AT/RT najczęściej występuje w lokalizacji podnamiotowej. Ze względu na to, że AT/RT jest rzadkim nowotworem, dalsza identyfikacja poszczególnych grup molekularnych jest konieczna dla przeprowadzenia korelacji biologiczno-klinicznych w tym rodzaju guza.

1.3.2. Nowotwory embrionalne NOS

Oprócz wyraźnie określonych kategorii, istnieją również przypadki nowotworów embrionalnych, które ze względu na brak informacji diagnostycznych, histologicznych bądź molekularnych nie mogą zostać zakwalifikowane do żadnej z powyższych grup guzów i oznaczane są jako „nieokreślone inaczej” (*not otherwise specified* - NOS).

1.3.3. Prymitywny nowotwór neuroektodermalny (*primitive neuroectodermal tumor*, PNET) – zmiana leksykonu diagnostycznego i zidentyfikowanie nowych podtypów molekularnych rzadkich nowotworów ośrodkowego układu nerwowego.

Według wcześniejszych koncepcji, termin PNET używano do określenia niskozróżnicowanych nowotworów zarówno w obrębie OUN, jak i poza układem nerwowym (np. mięsak Ewinga, obwodowy PNET). W ośrodkowym układzie nerwowym, nowotwory o obrazie morfologicznym *medulloblastoma*, zlokalizowane w półkulach mózgu, rozpoznawane były jako tzw. nadnamiotowy PNET (*supratentorial PNET*). Według klasyfikacji WHO 2007, termin CNS PNET obejmował podgrupę nowotworów zarodkowych, do której należał nabłoniak rdzeniakowy (*medulloepithelioma*), nerwiak zarodkowy (*neuroblastoma*), nerwiak zwojowokomórkowy zarodkowy (*ganglioneuroblastoma*) i wyściółczak zarodkowy (*ependymoblastoma*). Wszystkie te nowotwory posiadały najwyższy, czwarty stopień złośliwości histopatologicznej i charakteryzowały się komórkami neuroepitelialnymi o niskim stopniu zróżnicowania i wysokim indeksie proliferacyjnym. Często w diagnostyce różnicowej PNET brano pod uwagę *ependymoma* lub AT/RT [55].

W roku 2016 ukazała się wielośrodkowa praca potwierdzająca hipotezę, że nowotwory z grupy PNET stanowią grupę guzów o niespójnym obrazie histopatologicznym i klinicznym. Badanie przeprowadzono w oparciu o profilowanie metylacji genów na 211 przypadkach różnych nowotworów OUN, stanowiących próbki referencyjne i 323 przypadkach nowotworów, zdiagnozowanych wówczas jako PNET. Przy pomocy hierarchicznej analizy skupień wykazano, że aż 196 spośród 323 przypadków PNET zgrupowało się z próbkami innych nowotworów referencyjnych. Najwięcej przypadków zidentyfikowano jako glejaki o wysokim stopniu złośliwości (27%), ETMR (11%), rzadziej wyściółczaki (5%), AT/RT (4%), rdzeniaki (3%), glejaki linii środkowej K27M (3%), szyszyniaki (2%), mięsaki Ewinga (2%), CPC (1%), żółtakogwiaździaki pleomorficzne (<1%) i oponiaki (<1%). Co istotne, wyodrębniono cztery nowe rodzaje guzów: CNS EFT-CIC (*CNS Ewing sarcoma family tumor with CIC alteration*), CNS NB-FOXR2 (*CNS neuroblastoma with FOXR2 activation*), jak również CNS HGNET-BCOR (*CNS high-grade neuroepithelial tumor with BCOR alteration*) i CNS HGNET-MN1 (*CNS high-grade neuroepithelial tumor with MN1 alteration*) [56].

Guzy CNS EFT-CIC i CNS NB-FOXR2 zlokalizowane są nadnamiotowo, a CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1 występują zarówno nadnamiotowo, jak i w tylnym dole czaszki. Nazwa własna nowych nowotworów pochodzi od zidentyfikowanych zmian genetycznych, specyficznych dla poszczególnych guzów.

I tak, w przypadku guzów CNS EFT-CIC zmiany występują w genie *CIC*, zlokalizowanym na chromosomie 19. Charakterystyczną zmianą jest fuzja genu *CIC* z genem *NUTM1*, zlokalizowanym na chromosomie 15, oraz delecje z przesunięciem ramki odczytu w genie *CIC*. Występowanie tych nieprawidłowości można potwierdzić przy użyciu metody Break Apart FISH [56].

Guzy grupy CNS NB-FOXR2 charakteryzują się podwyższoną ekspresją genu *FOXR2*, zlokalizowanego na chromosomie X, w stosunku do innych nowotworów OUN. Wynika to z obecności duplikacji sekwencji nukleotydowych kodujących *FOXR2* i fuzji *FOXR2* z różnymi genami, w tym *LINC00486*, *TM7SF3* czy *FRMD4A* [57].

Nowotwory CNS HGNET-BCOR posiadają duplikacje genu *BCOR*, podobne do mięsaków nerki [58, 59]. Co ciekawe, w niektórych guzach tej grupy zanotowano aktywację szlaku Wnt, objawiającą się wysoką ekspresją β -kateniny, podobnie jak w przypadku grupy molekularnej *medulloblastoma WNT-activated*.

Nowotwory CNS HGNET-MN1 charakteryzują się fuzją genu *MNI*, zlokalizowanego na chromosomie 22, z genem *BEND2* zlokalizowanym na chromosomie X bądź z genem *CXXC5* zlokalizowanym na chromosomie 5. W guzach tych zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu *BEND2*.

Nie posiadamy wystarczającej wiedzy na temat zarówno biologii jak i korelacji biologiczno-klinicznych dla poszczególnych grup tych nowotworów, a jej uzupełnienie może być procesem długotrwałym ze względu na małą liczbę przypadków. Nieocenionym materiałem do kontynuowania badań może okazać się materiał zdeponowany w postaci bloczków parafinowych. Niemniej, na podstawie dotychczasowych analiz, ujawniono korelacje biologiczno-kliniczne dla poszczególnych rodzajów guzów, np. związek ze złym rokowaniem dla CNS HGNET-BCOR i CNS EFT-CIC oraz dobrym rokowaniem dla CNS HGNET-MN1 i CNS NB-FOXR2 [56, 60].

1.4. Inne nowotwory podnamiotowe wieku dziecięcego o wysokim stopniu złośliwości

Oprócz opisanych powyżej złośliwych nowotworów podnamiotowych wieku rozwojowego do badań włączono również raka spłotu naczyniówkowego oraz glejaka z grupy HGG, zlokalizowane w tylnym dole czaszki.

1.4.1. Nowotwory spłotu naczyniówkowego

Nowotwory spłotu naczyniówkowego (*choroid plexus tumors*, CPTs) wywodzą się z komórek nabłonka spłotu naczyniówkowego komór mózgu. Są to nowotwory rzadkie, występujące przede wszystkim u dzieci, gdzie stanowią 1-4% wszystkich przypadków guzów wieku dziecięcego.

Klasyfikacja WHO nowotworów CNS2021 wyróżnia trzy podtypy histologiczne nowotworów nabłonka spłotu naczyniówkowego:

- brodawczak spłotu naczyniówkowego, WHO G1 (*choroid plexus papilloma*, CPP),
- atypowy brodawczak spłotu naczyniówkowego, WHO G2 (*atypical choroid plexus papilloma*, aCPP),
- rak spłotu naczyniówkowego, WHO G3 (*choroid plexus carcinoma*, CPC).

Obraz histologiczny CPC przedstawia złośliwy nowotwór nabłonkowy o dużym zagęszczeniu komórek nowotworowych, z obszarami martwicy i wysoką aktywnością mitotyczną. W diagnostyce różnicowej należy uwzględnić inne nowotwory, takie jak AT/RT

i *ependymoma*. Istotnym czynnikiem wpływającym na przeżycie pacjenta jest całkowita resekcja guza, przy czym większość pacjentów poddawana jest również chemioterapii.

Pierwsze badania genetyczne w CPC wykazały obecność mutacji genu *TP53* i powiązanie występowania tego nowotworu z zespołem Li-Fraumeni [61]. Mutacja *TP53* występuje w przypadku połowy pacjentów z CPC, przy czym ilość kopii zmutowanego genu znacząco wpływa na współczynnik przeżycia (OS, *overall survival*). Obecność dwóch zmutowanych kopii genu *TP53* związana jest z gorszym przeżyciem OS, wynoszącym 14,3%, w stosunku do pacjentów posiadających jedną kopię zmutowanego genu *TP53* (OS = 66,7%). Natomiast pacjenci nie posiadający zmutowanego genu *TP53* wykazywali najwyższy współczynnik przeżycia całkowitego, sięgający nawet 98,4% [62]. Dzięki badaniu poziomu ekspresji genów, metylacji DNA, analizie ASCAT (*Allele-Specific Copy Number Analysis*), czy sekwencjonowaniu DNA wykluczono progresję z formy brodawczaka do raka splotu naczyniówkowego, określono ploidalność tych nowotworów oraz wykazano obecność korelacji obrazu klinicznego z podłożem molekularnym. Badania molekularne potwierdziły różne podłoże genetyczne CPP, aCPP i CPC oraz odmienny rozkład wiekowy i odmienne rokowanie [63]. Niemniej w chwili obecnej nie są znane precyzyjne markery prognostyczne i diagnostyczne dla poszczególnych nowotworów splotu naczyniówkowego i ich poszukiwanie jest szczególnie istotne w przypadku CPC, którego zła diagnoza łączy się z koniecznością włączenia agresywnej terapii.

1.4.2. Glejaki wieku dziecięcego o wysokim stopniu złośliwości

Glejak jest najczęstszym nowotworem diagnozowanym u dzieci, włączając glejaki niskiego stopnia złośliwości. W ostatnich latach ukazały się liczne doniesienia dotyczące charakterystyki molekularnej glejaków, które miały wpływ na kolejne zmiany ich klasyfikacji.

Okazało się, że glejaki wieku dziecięcego o wysokim stopniu złośliwości (*pediatric-type diffuse high-grade gliomas*, pHGG) stanowią odmienną grupę guzów w porównaniu z glejakami osób dorosłych.

Według klasyfikacji WHO CNS 2021 [1] w grupie pHGG znajduje się:

- glejak linii środkowej, obecnie klasyfikowany jako rozlany glejak linii środkowej H3 K27-altered (*diffuse midline glioma, H3 K27-altered*), WHO G4,
- rozlany glejak półkul H3 G34-mutant (*diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant*), WHO G4

- rozlany glejak wieku dziecięcego *H3-wildtype* i *IDH-wildtype* (*diffuse pediatric-type high-grade glioma, H3-wildtype and IDH-wildtype*), WHO G4.

Są to nowotwory odznaczające się złą prognozą, zarówno u dzieci, jak i u dorosłych [64, 65]. Pierwsze badania molekularne glejaków wieku dziecięcego skupiały się przede wszystkim na guzach zlokalizowanych w obszarze nadnamiotowym. Wyodrębniono nowe grupy molekularne, w tym rozlanego glejaka linii środkowej H3 K27-*mutant* [66, 67]. Charakteryzuje się on występowaniem mutacji w jednym z genów *H3F3A*, *HIST1H3B* lub *HIST1H3C* kodujących białko histonowe H.3 i jego warianty H3.1. lub H3.3. Choć glejaki wysokiego stopnia występują głównie nadnamiotowo, to wariant H3 K27-*mutant* występuje również podnamiotowo, głównie w moście. Potwierdzono również przypadek glejaka z mutacją kodonu K27 w obrębie genu kodującego histony H3 w rdzeniu kręgowym. Jak wspomniano, glejaki H3 K27-*mutant* diagnozowane są głównie u dzieci i młodych dorosłych. Inny, typowy dla wieku dziecięcego molekularny podtyp glejaka H3 G34-*mutant* dotychczas nie został zdiagnozowany w lokalizacji podnamiotowej.

Wyodrębniono również u dzieci guzy z innymi zmianami genetycznymi, takimi jak mutacje *IDH1*, *BRAF*, czy amplifikacja genu *MYCN*. Mutacje w genie *IDH1* bądź *IDH2* u dorosłych stanowią podstawę rozróżniania dwóch grup glejaków o odmiennych prognozach – *IDH-wildtype* i *IDH-mutant*. Pomimo, że u dorosłych mutacje *IDH* są bardzo częste i istotne ze względów diagnostycznych i klinicznych, glejaki *IDH-mutant* w przypadkach pediatrycznych stanowią niewielki odsetek, bez znaczenia prognostycznego [68]. Wymienione powyżej grupy złośliwych glejaków, oprócz grupy H3 K27-*mutant*, nie zostały zdiagnozowane dotychczas w lokalizacji podnamiotowej, dlatego nie były przedmiotem prowadzonych badań [69].

1.5. Zintegrowana diagnoza histopatologiczno-molekularna

Ocena histopatologiczna jest standardem diagnostycznym, jednakże w świetle najnowszych doniesień opisujących podłoże molekularne guzów przedstawia niepełny obraz choroby. Kryteria histopatologiczne w niektórych przypadkach guzów są wysoce nieprecyzyjne i subiektywne. Tak jest w przypadku *ependymoma* o drugim i trzecim stopniu złośliwości, gdzie ocena preparatów nie zawsze pozostaje obiektywna [70]. Nie opisano dotychczas żadnych różnic w obrazie histopatologicznym pomiędzy grupami molekularnymi *ependymoma*. Biorąc pod uwagę implikacje kliniczne wynikające z przynależności do grupy PFA bądź PFB, rozpoznanie wyłącznie na podstawie obrazu histopatologicznego pozostaje zbyt ubogim źródłem informacji.

Warto zaznaczyć, że podtypy histopatologiczne nie wykazują ścisłej korelacji z grupami molekularnymi. W przypadku Grupy 3 *medulloblastoma* obserwujemy znaczną przewagę podtypu klasycznego, jednak ten sam podtyp występuje równie często w znacznie lepiej rokującej grupie transkrypcyjnej WNT. Wystąpienie podtypu LCA jest powiązane z gorszym rokowaniem w porównaniu do pozostałych podtypów histopatologicznych, ale obserwuje się go w różnych grupach molekularnych.

Istnieją również przypadki trudne do zdiagnozowania, które przypominają histologicznie inne nowotwory mózgu, bądź wykazują lokalizację typową dla innego rodzaju nowotworu. Na przykład CPC pod względem obrazu histopatologicznego może przypominać AT/RT lub *medulloblastoma*. Problemy diagnostyczne mogą pojawić się w przypadku przewagi elementów niskozróżnicowanych w obrazie morfologicznym. By wykluczyć AT/RT stosuje się badanie immunohistochemiczne, jakim jest jądrowa ekspresja białka INI1 [45]. Ponadto CPC i *medulloblastoma* z grupy WNT mogą lokalizować się w kącie mostkowo-mózdkowym z podobną częstotliwością, wobec czego dodatkowe markery różnicujące te dwa typy guzów będą bardzo przydatne dla postawienia prawidłowej diagnozy.

Ostatnio opisano nowe przypadki guzów mózgu z grupy CNS HGNET, których charakterystyka molekularna również potwierdza potrzebę wprowadzenia markerów molekularnych do klasyfikacji guzów pediatrycznych OUN. Guzy CNS HGNET-MN1 i CNS HGNET-BCOR mogą sprawiać największe problemy przy ocenie histopatologicznej, ponieważ do tej pory diagnozowane były najczęściej jako *astroblastoma*, *ependymoma*, *meningioma*, *anaplastic astrocytoma* i *medulloblastoma*. Natomiast guzy CNS EFT-CIC i CNS HGNET-FOXR2 mylnie rozpoznawano jako glejaki i wyściółczaki [56].

Podsumowując, chociaż podtypy histologiczne poszczególnych nowotworów mają pewne znaczenie prognostyczne, jak w przypadku LCA *medulloblastoma*, klasyfikacja histopatologiczna jest mało precyzyjna, wysoce subiektywna i nie zawsze koreluje z obrazem klinicznym. Dlatego konieczne jest uzupełnienie obrazu histopatologicznego o klasyfikację molekularną w przypadku złośliwych nowotworów mózgu u dzieci. Proponujemy zastosowanie metody opartej na profilu transkrypcyjnym szeregu genów markerowych, w uzupełnieniu do dotychczas stosowanych badań patomorfologicznych i klinicznych.

1.6. Nowe możliwości profilowania ekspresji genów

Utrwalenie materiału biopsyjnego, pooperacyjnego bądź sekcyjnego w formalinie i zatopienie w parafinie jest metodą stosowaną powszechnie od 100 lat. Materiał FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) używany jest przede wszystkim do barwień histopatologicznych, histochemicznych i immunohistochemicznych [71, 72]. Niestety, zatapianie materiału w bloczkach parafinowych obarczone jest dużym ryzykiem niekorzystnego wpływu formaliny i parafiny na struktury tkankowe [73]. Zmiany zachodzące w procesie utrwalania preparatów parafinowych dotyczą struktury DNA i RNA. Obserwuje się zamianę cytozyny w tyminę, a także deaminację próbek [74]. Wszystkie powyżej wymienione zjawiska wpływają na jakość RNA i jego integralność, wyrażoną w jednostce RIN (*RNA integrity number*), które są kluczowe dla zaawansowanych badań z zakresu biologii molekularnej. Niska jakość RNA stanowi często podstawę wykluczenia materiału FFPE z przeprowadzanych analiz.

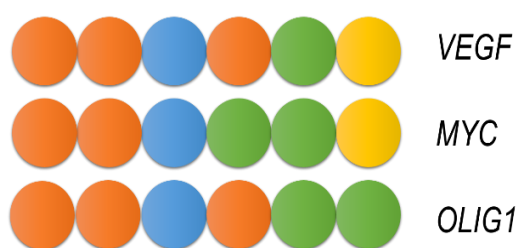
Aktualne podziały na grupy molekularne nowotworów OUN stworzone zostały w oparciu o analizę mikromacierzy ekspresyjnych, przy użyciu zamrożonego materiału tkankowego. Metoda ta nie jest optymalnym rozwiązaniem dla celów diagnostycznych ze względu na brak możliwości wykonania takich badań w większości laboratoriów szpitalnych. W ostatnim czasie ukazało się nowe rozwiązanie biotechnologiczne - analiza nCounter w oparciu o technologię NanoString [75]. Jest to analiza pomiaru poziomu ekspresji genów bez zastosowania etapów odwrotnej transkrypcji i amplifikacji.

1.6.1. Technologia NanoString, system analizy nCounter

System analizy nCounter (NanoString Technologies) oparty jest na zjawisku hybrydyzacji. Badane fragmenty RNA ulegają połączeniu z sondami molekularnymi na zasadzie komplementarności [76-78]. Firma NanoString Technologies posiada gotowe do użycia panele genów, zaprojektowane do analizy molekularnej nowotworów oraz panele immunologiczne. Możliwe jest również zaprojektowanie własnych zestawów dla indywidualnych potrzeb użytkownika.

Każda sonda molekularna składa się z dwóch komponentów – sondy reporterowej i biotynylowanej sondy wiążącej. Część reporterowa złożona jest z elementów sygnałowych, nazwanych przez producenta molekularnymi kodami kreskowymi (*molecular barcodes*). Molekularne kody kreskowe zawierają unikalne dla każdego wybranego przez nas genu połączenia kolorystyczne, złożone z czterech podstawowych kolorów w sześciu pozycjach

części reporterowej, co daje możliwość analizy aż do 800 genów w jednym doświadczeniu (Rycina 5).



Rycina 5. Przykładowe „molekularne kody kreskowe” genów *VEGF*, *MYC* i *OLIG1*. Dla każdego wybranego genu zaprojektowane jest unikalne połączenie kolorystyczne. W jednym eksperymencie możemy utworzyć 800 różnych kombinacji czterech kolorów w sześciu pozycjach części reporterowej reprezentujących 800 wybranych przez nas sekwencji genów.

Każdy kod kreskowy odpowiada jednej molekuule i dzięki temu system analiz nCounter ocenia rzeczywistą ilość cząsteczek w dostarczonej próbce – w naszym przypadku rzeczywistą ilość kopii wybranej sekwencji genów w próbce natywnego RNA. Natomiast wiążąca sonda biotynylowana niezbędna jest do związania kompleksu sondy z odcinkiem RNA do płytki immobilizującej i tym samym umożliwienia

wyflukowania niezwiązanych zbędnych odcinków. Związane kompleksy skanowane są automatycznie za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Każdy pojedynczy sygnał, a tym samym połączenie kolorystyczne, zliczane jest i eksportowane w formie plików .RCC w celu kolejnych analiz cyfrowych przy pomocy oprogramowania nSolver.

Analiza za pomocą systemu nCounter umożliwia pracę ze zdegradowanym RNA, pozyskanym z preparatów FFPE i pozwala na uniknięcie błędów, którymi obarczone są inne metody biologii molekularnej, w których głównymi etapami są np. odwrotna transkrypcja, czy amplifikacja cDNA. Ponadto na postawienie diagnozy w oparciu o tą analizę potrzeba tylko dwóch dni od czasu wyizolowania RNA, co jest krótszym czasem w porównaniu do technik opartych na analizach mikromacierzy, czy sekwencjonowania.

1.6.2. Dotychczasowe wykorzystanie metody NanoString w onkologii dziecięcej

Do momentu podjęcia badań w ramach przedstawianej rozprawy doktorskiej opublikowano tylko jedną pracę opisującą zastosowanie technologii NanoString do analizy *medulloblastoma* [79]. W badaniu tym podjęto próbę sklasyfikowania *medulloblastoma* do czterech grup molekularnych za pomocą 22 genów markerowych. Materiałem było 130 próbek zamrożonej tkanki guza i 84 próbek FFPE. W trakcie analizy materiału świeżo zamrożonego wykazano, że zastosowanie systemu analiz NanoString w 98% przypadków klasyfikuje guzy do odpowiednich grup molekularnych. By upewnić się, co do możliwości użycia tych 22 genów markerowych w przypadku materiału FFPE, analizowano próbki z trzech niezależnych laboratoriów i wykazano, że przygotowany zestaw genów klasyfikuje *medulloblastoma* do

czterech grup molekularnych z wysoką skutecznością (87,5% przypadków). Stanowi to dowód na to, że system analiz oparty na technologii NanoString mógłby zastąpić mniej opłacalną technikę mikromacierzy ekspresyjnych w identyfikacji grup molekularnych *medulloblastoma* i tym samym zmniejszyć koszty pracy laboratoriów, jak również nakład pracy i czas potrzebny dla stratyfikacji pacjentów do poszczególnych grup ryzyka. Wyżej wspomniane zalety powodują, że system analiz oparty na technologii NanoString może być atrakcyjną metodą w przypadku przeprowadzenia kompetentnych biologicznie badań klinicznych.

Można mieć nadzieję, że dzięki wykorzystaniu technologii NanoString uda się zidentyfikować specyficzne markery biologiczne grup i podgrup molekularnych badanych guzów wieku dziecięcego. Może to w przyszłości przyczynić się do zmian w procedurach diagnostycznych oraz w badaniach klinicznych. Wykorzystując bloczki parafinowe, badania te mogą wpisać się w codzienną i rutynową praktykę diagnostyczną, uwzględniając aspekty ekonomiczne i organizacyjne instytucji szpitalnych.

2. Cel pracy

W erze profilowania genetycznego nowotworów, kryteria diagnostyczne i rokownicze w nowotworach układu nerwowego, oparte na czynnikach klinicznych i histopatologicznych, wymagają uzupełnienia o informacje z zakresu biologii molekularnej.

Głównym celem pracy było zaprojektowanie i przetestowanie nowej unikalnej sygnatury ekspresyjnej, przydatnej do diagnostyki i klasyfikacji podnamiotowych guzów mózgu o wysokim stopniu złośliwości u dzieci. Badania prowadzono na archiwalnym materiale bloczków parafinowych guzów mózgu przy użyciu techniki NanoString nCounter Analysis System, opartej na równoczesnej analizie ekspresji wielu genów.

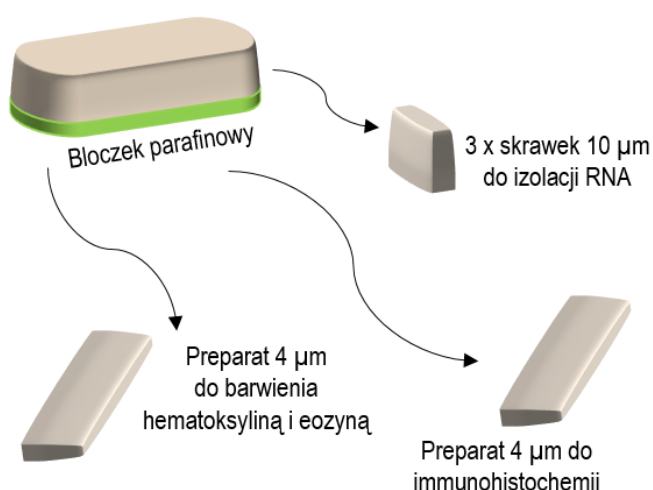
Szczegółowe cele badawcze obejmowały:

1. Identyfikację genów markerowych dla wybranych guzów podnamiotowych wieku dziecięcego przy pomocy analizy *in silico* surowych danych mikromacierzy ekspresyjnych.
2. Przeprowadzenie analizy ekspresji wybranych genów markerowych w badanych guzach mózgu w oparciu o technologię NanoString i identyfikacja grup molekularnych przy pomocy hierarchicznej analizy skupień w oparciu o wielogenową sygnaturę ekspresyjną badanych genów.
3. Ustalenie zależności biologiczno-klinicznych w analizowanych przypadkach nowotworów i identyfikacja podgrup prognostycznych.
4. Porównanie wyników uzyskanych przy pomocy metody nCounter w technologii NanoString do danych literaturowych w celu określenia potencjału wykorzystania tej metody w rutynowej diagnostyce nowotworów OUN.
5. Ustalenie markerów immunohistochemicznych z potencjałem diagnostycznym dla wybranych rodzajów nowotworów.

3. Materiał i metody

Materiałem badawczym w przedstawionej pracy doktorskiej były bloczki parafinowe nowotworów OUN, pozyskane z archiwum Zakładu Patomorfologii Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”.

Selekcję materiału rozpoczęto od przeszukania bazy danych pacjentów pod względem przypadków odpowiadających następującym kryteriom: rozpoznanie nowotworu mózgu, lokalizacja podnamiotowa oraz stopień złośliwości 3 i 4 wg WHO. W przypadku wyściółczaków badaniami objęto również grupę guzów o drugim stopniu złośliwości histopatologicznej. Dane kliniczne każdego pacjenta wpisane zostały w Bazę Danych Pacjentów, a każdemu pacjentowi nadano anonimową sygnaturę, którą posługiwano się w dalszych etapach badań.



Rycina 6. Schemat przygotowania materiału z bloczka parafinowego.

Po utworzeniu Bazy Danych Pacjentów wyszukano dostępne bloczki parafinowe i oceniono ich przydatność dla dalszych badań molekularnych. Wyselekcjonowano tylko bloczki zawierające odpowiednią ilość materiału, który wystarczyłby do przeprowadzenia zaplanowanych analiz. Ostatecznie wyselekcjonowano materiał od 180 pacjentów: 96 bloczków z rozpoznaniem *ependymoma*, 71 bloczków

z rozpoznaniem *medulloblastoma*, 6 bloczków z rozpoznaniem CPC, 5 bloczków z rozpoznaniem AT/RT oraz 2 bloczki z rozpoznaniem HGG. Należy zaznaczyć, że nie zidentyfikowano w badanej serii guzów podnamiotowych żadnego przypadku z rozpoznaniem ETMR lub PNET. Schemat przygotowania materiału z bloczków parafinowych do dalszych badań przedstawiono na Rycinie 6. Z każdego wyselekcjonowanego bloczka parafinowego przygotowano preparat o grubości 4 µm i poddano go standardowemu barwieniu hematoksyliną i eozyną (H&E). Wybarwione preparaty zeskanowano za pomocą skanera Hamamatsu NanoZoomer 2.0 RS. Następnie przeprowadzono weryfikację rozpoznania histopatologicznego oraz ocenę procentowej zawartości tkanki nowotworowej w preparacie.

Do dalszych doświadczeń wykorzystywano materiał, który posiadał co najmniej 70% komórek nowotworowych. Dodatkowo uwzględniono uwagi dotyczące jakości preparatu, w tym obecności obszarów martwicy, ognisk krwotocznych lub zwapnień, które mogłyby wpływać na jakość izolowanego RNA. Ostatecznie wyselekcjonowano 159 bloczków, które spełniły ustalone kryteria. Dodatkowo skrojono skrawki o grubości 4 μm i przygotowano preparaty do barwień immunohistochemicznych.

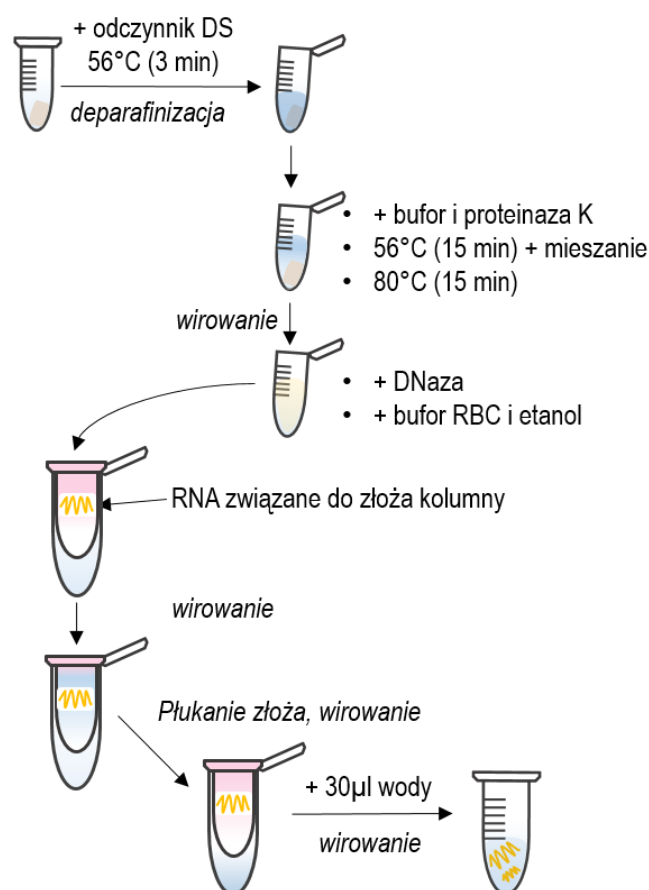
3.1. Przygotowanie skrawków parafinowych oraz izolacja RNA

Wyselekcjonowane bloczki krojono na mikrotomie Leica SM2000R do trzech próbek typu eppendorf, po trzy skrawki parafinowe o grubości 10 μm w każdej próbce. Aby zminimalizować szansę roztopienia parafiny i degradacji próbki, wszystkie próbki z materiałem przechowano w temperaturze -20°C .

3.2. Izolacja RNA

Izolację RNA przeprowadzono za pomocą zestawu RNeasy FFPE Kit (Qiagen, nr. kat. 73504), której uproszczoną procedurę pokazano na Rycinie 7. Używano plastiku o wysokiej jakości i czystości, dedykowanego do pracy z kwasami nukleinowymi, wolnego od RNaz. Odparafinowanie materiału do badań przeprowadzono dodając 320 μl odczynnika *Deparaffinization Solution* (Qiagen, nr. kat. 19093) do każdej próbki zawierającej skrawki parafinowe. Mieszaninę inkubowano przez 3 minuty w temperaturze 56°C . Po ostudzeniu próbek dodano 240 μl buforu lizującego PKD. Następnie wymieszano próbki za pomocą wytrząsarki (10 sekund) i poddano je wirowaniu (1 minuta, 10.000 RPM). Do odznaczającej się klarownej warstwy dodano 10 μl proteiny K w celu przeprowadzenia trawienia białek i usunięcia innych zanieczyszczeń.

Procedura izolacji RNA ze skrawków parafinowych



Rycina 7. Uproszczona procedura izolacji RNA ze skrawków parafinowych.
DS - Deparaffinization Solution, odczynnik do odparafinowania

Obecną w zestawie proteinazę K zamieniono na proteinazę K firmy Sigma-Aldrich (nr kat. P2308). Próbkę poddano 15 minutowej inkubacji w temperaturze 56°C. W trakcie inkubacji trzykrotnie wymieszano próbę za pomocą wytrząsarki. Następnie inkubowano próbkę w temperaturze 80°C przez 15 minut. Pobrano 200 µl klarownej warstwy próbki i przeniesiono ją do nowej probówki. Próbkę inkubowano na lodzie przez 3 minuty i następnie poddano wirowaniu (15 minut, 13500 RPM). Supernatant przeniesiono do nowej, wolnej od RNaz probówki. W celu pozbycia się zanieczyszczeń DNA do próbki dodano bufor DNase Booster (Qiagen) w ilości 10% całkowitej próbki i następnie 10 µl wymieszanej DNazy I (Qiagen). Próbkę wirowano trybem szybkim (15 sekund), a następnie inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. W następnym etapie doświadczenia do każdej z próbek dodano 500 µl buforu lizującego RBC, wymieszano przy pomocy pipety i dodano 1200 µl 100% etanolu. Pobrano 700 µl próbki do kolumnienki MinElute (Qiagen), umieszczonej w probówce o objętości 2 ml (Qiagen). Po ostrożnym zamknięciu probówki umieszczono je w wirówce i poddano szybkiemu wirowaniu (15 sekund, 10000 RPM). W tym etapie RNA wiąże się do złoża kolumnienki MinElute. Przeprowadzony przez kolumnienkę płyn wylano. Czynność powtórzono do momentu przejścia przez kolumnę całej próbki. Następnie do kolumny dodano 500 µl buforu RPE i próbki poddano szybkiemu wirowaniu, a następnie ponownie wirowano próbki z 500 µl buforu RPE przez 2 minuty (10000 RPM). Etap ten wykonywany jest dwukrotnie w celu dodatkowego oczyszczenia próbki z pozostałości alkoholu i soli, powodujących obniżenie jakości RNA. Kolumnę przełożono do nowej probówki o objętości 2 ml. Otwarte kolumnienki umieszczono w wirówce i poddano wirowaniu w najwyższej prędkości (13500 RPM) przez 5 minut. Kolumnę przełożono do nowej probówki i dodano 30 µl wolnej od RNaz wody. Końcowe, jednonumitowe wirowanie pozwoliło na uwolnienie RNA z kolumny i zawieszenie go w wodzie. Izolacje RNA przeprowadzone zostały zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. W wyniku przeprowadzonej izolacji otrzymano RNA zawieszony w 30 µl wody wolnej od RNaz. Przy użyciu aparatury ThermoScientific™ NanoDrop™ sprawdzono stopień czystości i ilości RNA.

3.3. Selekcja genów markerowych dla grup molekularnych analizowanych nowotworów mózgu – badania *in silico* surowych danych mikromacierzy

Proces identyfikacji genów markerowych został przeprowadzony w trzech etapach.

3.3.1. I etap – selekcja surowych danych mikromacierzy

W pierwszym etapie wyselekcjonowano oryginalne prace przedstawiające wyniki analiz nowotworów wieku dziecięcego OUN, dla których autorzy udostępnili w bazie Gene Expression Omnibus (GEO: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) surowe dane wyników mikromacierzy ekspresyjnych. Przyjęto kryteria selekcji danych według:

- wieku pacjenta w czasie diagnozy – poniżej 18 roku życia,
- lokalizacji guza – wyłącznie przypadki podnamiotowe,
- stopnia złośliwości histopatologicznej nowotworu wg WHO - 3 i 4, w przypadku wyściółczaków – 2 i 3,
- guzy analizowane na tej samej platformie Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0.

W sumie wyselekcjonowano 229 plików CEL. W celu identyfikacji genów markerowych dla poszczególnych nowotworów i ich grup molekularnych przeprowadzono analizę następujących plików CEL: 69 przypadków *ependymoma* ze zbioru GSE64415 [13], 99 przypadków *medulloblastoma* ze zbiorów GSE73038 [56] i GSE10327 [20], 21 przypadków AT/RT ze zbiorów GSE73038 i GSE70678 [80] oraz 40 nowotworów, które rzadko mogą występować w tylnym dole czaszki, tzn. K27 HGGs, ETMR, CNS HGNET-BCOR oraz CNS HGNET-MN1, wszystkie ze zbioru GSE73038.

3.3.2. II etap – analiza plików CEL w środowisku oprogramowania R

Pliki CEL załadowano do środowisko oprogramowania R i znormalizowano metodą MAS5, używając do tego biblioteki „*affy*”. Następnie wykonano normalizację kwantylową wszystkich próbek podnamiotowych nowotworów mózgu. Dane zostały zlogarytmowane (\log_2), następnie usunięto z analizy sondy macierzowe o najniższej wariancji (wariancja $<0,25$). W nadzorowanej części analizy, sondy macierzowe zostały wybrane przy pomocy testu t-Studenta. Próbkę przyporządkowaną do danej grupy diagnostycznej lub molekularnej były porównywane 100 razy do równolicznej losowej grupy próbek o odmiennej diagnozie lub grupie molekularnej. Miarą dobrego kandydata na marker molekularny była średnia wartość współczynnika istotności (*p-value*) oraz średnia krotność zmiany. Losowy wybór próbek oraz powtarzanie testu t-Studenta stukrotnie miało zapewnić większą stabilność wyboru markerów. Nadzorowane klastrowanie wykonano przy użyciu biblioteki „*squash*” z środowiska oprogramowania R.

Analiza plików w środowisku oprogramowania R wykonana została w ramach współpracy z dr Bartoszem Wojtasiem z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Laboratorium Neurobiologii Molekularnej (projekt NCN OPUS 2016/21/NZ2/01785).

3.3.3. III etap – porównanie danych literaturowych z wynikami analiz *in silico*

Dokonano przeglądu literatury w celu potwierdzenia, które ze zidentyfikowanych w trakcie powyższej analizy genów markerowych zostały już opisane przez innych badaczy. Ponadto włączono do badań dodatkowe geny markerowe, które zostały zaprezentowane w najnowszych publikacjach, przedstawiających wyniki dla szeregu mniejszych podgrup molekularnych, w przypadku których surowe dane mikromacierzy były niedostępne. Dotyczy to genów markerowych dla podgrup molekularnych PFA1 (markery *SKAP2* i *WIF1*) oraz PFA2 (markery *EN2*, *CNPY1*) *ependymoma* [15].

Stosując powyższe podejście, wysunięto najbardziej wiarygodne propozycje genów markerowych, które powinny mieć znaczenie diagnostyczne, bądź prognostyczne. Wyselekcjonowane geny markerowe stały się podstawą do zaprojektowania sond molekularnych, zastosowanych w technologii NanoString.

3.4. Przeprowadzenie eksperymentu w oparciu o technologię NanoString

Przygotowanie sond molekularnych, zawierające komponenty reporterowe, jak i biotynyłowane, odbywa się na zamówienie użytkownika. W celu złożenia zamówienia wypełniono specjalny formularz *CodeSet Design Form*, w którym zawarte są następujące informacje: numer sekwencji referencyjnej pobrany z bazy danych RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), nazwę genu oraz informację, czy jest to gen typu "housekeeping". Otrzymano do akceptacji informację dotyczącą szczegółów zaprojektowanych sond w formularzu „CodeSet Design Form Report”. Zawiera on dane dotyczące nazwy genu, numeru sekwencji referencyjnej, lokalizacji i sekwencji kompatybilnej do zaprojektowanej sondy oraz dodatkowe uwagi, dotyczące numerów eksonów.

3.4.1. Przygotowanie materiału, hybrydyzacja i procesowanie próbek

Zgodnie z zaleceniami producenta próbki RNA rozcieńczono do stężenia 40 ng RNA/ μ l. Do rozcieńczeń użyto wody wolnej od RNaz.

Pierwszym etapem doświadczenia było dodanie buforu reakcyjnego, sond molekularnych (*CodeSet*) i 5 μ l rozcieńczonego RNA do próbek w celu ich hybrydyzacji.

Mieszaninę inkubowano przez noc (ok. 16 h, 4°C). Następnie rozpoczęto drugi etap doświadczenia, którym było procesowanie próbek. Probówki z mieszaniną reakcyjną po całonocnej inkubacji umieszczono w stacji *nCounter Prep Station*. Trzyczęściowe kompleksy związane zostały dzięki części biotynylowanej do specjalnej, opłaszczonej streptawidyną powierzchni nośnika danych - kartridżu (*cartridge*). Następnie uruchomiono elektroforezę próbek w celu odpowiedniego ułożenia kompleksów na płytce, co pozwala na prawidłowe odczytanie sygnału fluorescencyjnego. Etap drugi zakończył się immobilizacją kompleksów na kartridżu. Pozyskanie danych odbyło się w trzecim, ostatnim etapie pracy metodą nazwaną NanoString nCounter Assay. Kartridż umieszczono w stacji *nCounter Digital Analyzer* i skanowano za pomocą funkcji automatycznego mikroskopu fluorescencyjnego. Poziom ekspresji genów oceniono przez zliczenie pojedynczych sygnałów unikalnego kodu kreskowego dla wybranego genu. Sygnały z kompleksów próbek RNA z sondami zostały zliczone i eksportowane w formacie plików RCC.

3.4.2. Technologia NanoString – normalizacja wyników i metody klastrowania próbek

Analizę wyników przy użyciu programu nSolver Analysis Software 4.0 wykonano w następujących etapach.

Dokonano importu plików RCC, zawierających dane z eksperymentów hybrydyzacji oraz plików RLF, zawierające dane charakteryzujące sondy molekularne. Wyselekcjonowano zbiór próbek, które poddano procesowi normalizacji. W procesie normalizacji wykorzystano 6 genów pozytywnej kontroli, analizowane geny markerowe i pięć genów referencyjnych (ang. *housekeeping*) - *ACTB*, *GAPDH*, *TBP*, *LDHA* i *TUBB*, które oznaczono jako „*Codeset*”. Do obliczenia czynnika formalizacji zastosowano metody kalkulacji, prezentowane jako ‘*default*’, tzn. średnią geometryczną oraz przedziały czynnika 0,3-3 dla pozytywnych kontroli i 0,1-10 dla „*Codeset*”. Znormalizowane dane zostały ocenione pod kątem kontroli jakości (*quality control*, QC), gdzie negatywnie ocenione próbki zostały oflagowane w celu ewentualnego usunięcia z dalszych analiz (komunikat „*QC flag*”). Raport kontroli jakości wykazał, że dwa geny referencyjne, *LDHA* i *TUBB*, wykazywały największe odchylenie standardowe poziomu ekspresji we wstępnej analizie, dlatego ostatecznie w kolejnych obliczeniach posłużono się tylko trzema genami *ACTB*, *GAPDH* i *TPB*. Znormalizowane dane oznaczone jako ‘*counts*’ wyeksportowano w postaci tabeli, którą zachowano w formie Excel dla dalszych analiz poza środowiskiem oprogramowania nSolver. Natomiast dane zachowane

w oprogramowaniu posłużyły do wykonania hierarchicznej analizy skupień dla wyselekcjonowanych próbek i zestawu genów adekwatnych dla poszczególnej analizy. Próbki ocenione jako oflagowane QC nie zostały uwzględnione w hierarchicznej analizie skupień. Jako podstawę obliczania klastrow przyjęto miarę odległości euklidesowej (*Euclidean distance*) oraz metodę średnich połączeń (*average linkage*).

3.5. Immunohistochemia

W celu sprawdzenia ekspresji genów *ALK* i *BCOR* na poziomie białka przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne na materiale FFPE. Odparafinowanie preparatów uzyskano poprzez zanurzanie szkiełek w ksylenie, mieszaniu etanol-ksylen oraz w roztworach alkoholi o zmniejszającym się stężeniu (Tabela 1). Efektem tej procedury jest zmiana potencjału preparatu z hydrofobowego na hydrofilowy.

Ksylen/alkohol	Czas płukania	Powtórzenia
Ksylen	8 minut	3
Ksylen/Alkohol etylowy absolutny (1:1)	8 minut	1
Alkohol etylowy absolutny	8 minut	2
Alkohol etylowy 96%	5 minut	2
Alkohol etylowy 70%	5 minut	1
Alkohol etylowy 50%	5 minut	1

Tabela 1. Opis procedury odparafinowania.

Następnie preparaty poddawano inkubacji w mieszaninie EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH, 10x (Dako, nr kat. K8004) w temperaturze 99,9°C przez 20 minut w celu odkrycia miejsc wiązania przeciwciał (odmaskowanie epitopu). Po inkubacji preparaty chłodzono, umieszczając w kominku reakcyjnym wypełnionym wodą z lodem przez 15 minut. Po wystudzeniu preparatu przeprowadzono dwukrotne płukanie w buforze płuczającym EnVision FLEX Washing Buffer (Dako, nr kat. K8007) przez 3 minuty. Ponieważ system detekcji w przeprowadzonych reakcjach immunohistochemicznych opierał się na użyciu peroksydazy, następny etap doświadczenia obejmował blokowanie endogennie występującej peroksydazy przez inkubację preparatów w EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako, nr kat. SM801) przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po dwukrotnym przepłukaniu preparatu w buforze EnVision FLEX Wash Buffer przez 3 minuty, rozpoczynano etap blokowania niespecyficznego miejsc wiązania z użyciem surowicy. Wybór surowicy uzależniony był od użytego w późniejszym etapie przeciwciała drugorzędowego, wobec czego

użyto 20% surowicy koziej rozpuszczonej w EnVision FLEX Antibody Diluent (Dako, nr kat. K8006). Mieszaninę przeciwciała pierwszorzędowego, rozpuszczonego w EnVision FLEX Antibody Diluent, nakładano na preparaty i pozostawiano na noc w temperaturze 4°C. Wykaz przeciwciał i użytych stężeń przedstawia Tabela 2.

Białko	Klonalność	Pochodzenie	Reaktywność	Rozcieńczenie	Producent	Nr kat.
ALK	Monoklonalne	Królik	Człowiek	1:250	Cell Signaling	D5F3
BCOR	Poliklonalne	Królik	Człowiek, mysz	1:400	Santa Cruz	sc-514576

Tabela 2. Użyte do doświadczeń przeciwciała pierwszorzędowe wraz ze specyfikacją.

Po całonocnej inkubacji, drugi dzień doświadczenia obejmował wizualizację związanego przeciwciała pierwszorzędowego przeciw ALK (Cell Signaling, nr kat. D5F3) i BCOR (Santa Cruz, nr kat. sc-514576). Wielokrotne płukanie przeprowadzano przy pomocy EnVision FLEX Wash Buffer. Na preparaty nakropiono przeciwciało drugorzędowe związane z peroksydazą chrzanową w postaci odczynnika EnVision+ System - HRP, Labelled Polymer, Anti-Rabbit (Dako, nr kat. K400311-2). Preparaty inkubowano przez godzinę, a następnie płukano. Wywoływanie sygnału peroksydazy chrzanowej odbywało się za pomocą DAB Quanto Chromogen (Thermo Scientific, nr kat. V-TA-060-QHDX), rozpuszczonego w buforze EnVision FLEX Substrate Buffer. W zależności od natężenia sygnału preparaty inkubowano w powyższej mieszaninie do 10 minut. Następnie preparaty płukano i poddawano barwieniu hematoksyliną i eożyną z użyciem DAKO Real Hematoxylin (Dakocytomation, nr kat. S202084) i wody dejonizowanej. Ostatni etap barwień obejmował odwadnianie preparatu z użyciem alkoholi o wzrastającym stężeniu i ksylenu (Tabela 3) i utrwalaniu preparatu z użyciem odczynnika DPX Mountant (Sigma Aldrich, NA.47).

Alkohol/ksylen	Czas płukania	Powtórzenia
Alkohol etylowy 70%	1 minuta	2
Alkohol etylowy 96%	1 minuta	2
Alkohol etylowy absolutny	1 minuta	2
Ksylen	1 minuta	4

Tabela 3. Użyte do odwadniania preparatu alkohole i ksylen wraz z opisem procedury.

Uzyskane preparaty wybarwione metodą immunohistochemiczną skanowano za pomocą skanera Hamamatsu NanoZoomer 2.0 RS w oryginalnym powiększeniu 40x.

3.6. Analiza statystyczna

Dane kliniczne pacjentów (podtyp histologiczny nowotworu, wiek w dniu postawienia diagnozy, lokalizacja guza, płeć pacjenta, stopień złośliwości histologicznej według WHO, informacja o wystąpieniu przerzutu, informacja o wznowie choroby i zgonie, przeżycie wolne od progresji (*progression-free survival*, PFS) i przeżycie całkowite (*overall survival*, OS) przedstawione w miesiącach, umieszczono w bazie danych programu IBM SPSS Statistics 26 i GraphPad Prism 9. Do informacji dodano również wynik analizy przynależności do grupy i podgrupy molekularnej.

3.6.1. Analiza krzywych przeżycia

Analizę krzywych przeżycia wg Kaplana-Meiera wykonano dla współczynnika OS i PFS przy pomocy oprogramowania GraphPad Prism 9. Znamienność statystyczną różnic w przeżyciu pacjentów oparto o wyniki Log Rank testu.

Przy pomocy formatu pliku „*Survival*” przygotowano tabelkę, zawierającą dane dotyczące wznowy choroby i zgonu pacjenta. Przy użyciu funkcji „*Analyze* → *Survival analysis* → *Simple Survival Analysis*” zaznaczono odpowiednie kolumny danych grup, bądź podgrup molekularnych. Przy obliczaniu współczynnika OS, zdarzeniem był zgon pacjenta, przy współczynniku PFS, zdarzenie określone zostało jako wznowa procesu nowotworowego. Następnie zakodowano dane i każde zdarzenie opatrzone cyfrą „1”, brak zdarzenia jako „0”. Dla oznaczenia zdarzenia w sekcji „*Death/Event*” wybrano cyfrę „1”. W celu porównania poziomu istotności próbek wybrano statystykę testową „*Logrank (Mantel-Cox test)*”.

3.6.2. Pozostałe analizy

Pozostałe analizy statystyczne wykonano w programie IBM SPSS Statistics 26. Dla oceny różnic w dwóch grupach wiekowych wykonano test Levene’a, aby sprawdzić równość wariancji, następnie odczytano poziom istotności testu t-Studenta dla prób niezależnych. Dla oceny różnic w czterech grupach molekularnych *medulloblastoma* wykonano jednoczynnikowy test ANOVA.

Dla oceny korelacji pomiędzy przynależnością do dwóch różnych grup molekularnych, a takimi parametrami jak płeć pacjenta, obecność przerzutów, stopień złośliwości nowotworu, wykonano test Fishera. Dla oceny korelacji pomiędzy przynależnością do czterech różnych grup molekularnych wykonano test Chi².

4. Wyniki

4.1. Selekcja materiału nowotworowego do badań NanoString

Przygotowano bazę danych, która zawierała listę 220 pacjentów leczonych w Instytucie „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, dla których można było uzyskać materiał z podnamiotowych guzów mózgu. Pozyskano 220 bloczków parafinowych przechowywanych w archiwum Zakładu Patomorfologii IPCZD. Po wstępnej ocenie, wyeliminowano bloczki z niewystarczającą ilością tkanki materiału nowotworowego. Ostatecznie do dalszej analizy wybrano 180 bloczków. Wszystkie bloczki skrojono i wykonano rutynowe barwienia hematoksyliną eozyną (H&E). Po ocenie histopatologicznej, potwierdzającej rozpoznanie oraz po zastosowaniu przyjętych kryteriów jakości i ilości materiału, do dalszych badań zakwalifikowano materiał ze 159 bloczków. Otrzymane skrawki umieszczono w probówkach i wykonano ekstrakcję RNA. W sumie wyizolowano RNA ze 145 próbek, w tym 85 przypadków *ependymoma*, 46 przypadków *medulloblastoma*, 1 przypadku HGG, 2 przypadków AT/RT i 4 przypadków CPC, a także dodatkowo z 6 próbek referencyjnych, w tym 2 glejaków, 2 guzów CNS HGNET-BCOR, 1 guza CNS HGNET-MN1 oraz 1 *medulloblastoma* z obecnością mutacji genu *CTNNB1*, potwierdzającą przynależność do grupy transkrypcyjnej WNT. Oceniono jakość i ilość wyizolowanego RNA i ostatecznie 113 próbek zakwalifikowano do pierwszego etapu analizy nCounter (hybrydyzacja).

4.2. Selekcja genów markerowych

Porównanie wyników mikromacierzy z czterech baz danych zawierających wyniki ekspresji genów dla *ependymoma*, *medulloblastoma* oraz innych rzadko występujących guzów podnamiotowych - AT/RT, ETMR, pHGG, CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1, pozwoliło na wyselekcjonowanie genów markerowych dla badanych grup nowotworów.

4.2.1. Geny markerowe dla *ependymoma*

Wyniki ekspresji genów pochodzące ze wszystkich 69 przypadków *ependymoma* (GSE64415) porównano do 162 pozostałych podnamiotowych nowotworów OUN. Przygotowano listę 10 genów kandydatów, które wykazały największą znamienność statystyczną w różnicowaniu *ependymoma* od pozostałych guzów. Tylko geny o wysokiej ekspresji zostały uwzględnione w trakcie dalszej analizy przy pomocy metody nCounter. Ostatecznie wyselekcjonowano geny

FAM81B, *EMC2* i *CAPS*, które wykazały najwyższy poziom ekspresji jako geny markerowe dla całej grupy *ependymoma* (Tabela 4).

Tabela 4. Geny markerowe dla grupy *ependymoma*.

Grupa	Sonda	Nazwa genu	Pozycja znamienności statystycznej
EPN	1555804_a_at	<i>MAP3K19</i>	1
	1553635_s_at	<i>TCTEX1D1</i>	2
	227848_at	<i>PEBP4</i>	3
	236085_at	<i>CAPSL</i>	4
	240065_at	<i>FAM81B</i>	5
	206101_at	<i>ECM2</i>	6
	231549_at	<i>C1orf158</i>	7
	229012_at	<i>C9orf24</i>	8
	226424_at	<i>CAPS</i>	9
	203397_s_at	<i>GALNT3</i>	10

W celu identyfikacji genów markerowych dla grup molekularnych, wyniki ekspresji genów dla 62 PFA i 7 PFB z bazy GSE64415 porównano do 99 *medulloblastoma* z baz GSE73038 i GSE10327, 21 podnamiotowych AT/RT z baz GSE73038 i GSE70678 oraz 40 innych, rzadkich nowotworów podnamiotowych, w tym glejaka linii środkowej H3 K27-*altered*, ETMR, CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1 z bazy GSE73038. Tym sposobem uzyskano po 20 kandydatów na geny markerowe, które wykazały najbardziej znamienne różnice, specyficzne dla każdej grupy. W trakcie dalszej selekcji uwzględniono tylko geny ulegające wysokiej ekspresji (Tabela 5).

Tabela 5. Geny markerowe dla grupy PFA i PFB *ependymoma*.

Grupa	Sonda	Nazwa genu	Średnia krotność zmiany ekspresji genów	Pozycja znamienności statystycznej
PFA	207695_s_at	<i>IGSF1</i>	60,9	2
	227848_at	<i>PEBP4</i>	54,1	17
	224339_s_at	<i>ANGPTL1</i>	50,7	16
	237058_x_at	<i>SLC6A13</i>	38,9	5
	239183_at	<i>ANGPTL1</i>	36,7	20
	231063_at	NA	35,7	13
	1555396_s_at	<i>CXorf67*</i>	26,8	1
	244084_at	<i>AIFM3</i>	20,6	7
	203571_s_at	<i>ADIRF</i>	19,3	12
	1557286_at	NA	18,7	11
	226420_at	<i>MECOM</i>	16,5	19
	221884_at	<i>MECOM</i>	16,1	8

	205208_at	<i>ALDH1L1</i>	10,0	3
PFB	232005_at	<i>DNAH1</i>	45,2	15
	1553133_at	<i>C9orf72</i>	10,1	19
	1569305_a_at	NA	9,9	18
	219644_at	<i>CEP83</i>	7,9	7
	225919_s_at	<i>C9orf72</i>	6,2	17
	1552816_at	<i>NXNL2</i>	5,4	2

* nazwa genu CXorf67 uległa zmianie w roku 2019 na EZHIP.

4.2.2. Geny markerowe dla *medulloblastoma*

Porównanie poziomu ekspresji genów w 99 *medulloblastoma* (MB) z baz GSE73038 i GSE10327 do pozostałych 132 nowotworów podnamiotowych, pozwoliło na wyłonienie 10 najbardziej znamiennych kandydatów na geny markerowe, w tym 3 geny *SSTR2* (reprezentowany przez trzy sondy), *ACTL6B* i *NEUROD1*, które wykazywały wysoką ekspresję w całej grupie *medulloblastoma* w porównaniu do pozostałych analizowanych guzów (Tabela 6).

Tabela 6. Geny markerowe dla grupy *medulloblastoma*.

Grupa	Sonda	Nazwa genu	Pozycja znamienności statystycznej
MB	239031_at	<i>SSTR2</i>	1
	214597_at	<i>SSTR2</i>	2
	233310_at	NA	3
	214495_at	<i>CACNG2</i>	4
	206014_at	<i>ACTL6B</i>	5
	1556057_s_at	<i>NEUROD1</i>	6
	1553997_a_st	<i>ASPHD1</i>	7
	205551_at	<i>SV2B</i>	8
	217455_s_at	<i>SSTR2</i>	9
	204260_at	<i>CHGB</i>	10

W przypadku grup molekularnych *medulloblastoma* porównano każdą grupę wobec innych typów nowotworów nie posiadających diagnozy *medulloblastoma* i wyznaczono po 20 kandydatów na geny markerowe. Podobnie, jak w przypadku *ependymoma*, wybrano 20 genów markerowych o najwyższej istotności statystycznej, a następnie najwyższej średniej krotności zmiany ekspresji genów dla czterech grup molekularnych rdzeniaka (Tabela 7).

Tabela 7. Geny markerowe dla czterech grup molekularnych *medulloblastoma*.

Grupa	Sonda	Nazwa genu	Średnia krotność zmiany ekspresji genów	Pozycja znamienności statystycznej
WNT	210134_x_at	<i>SHOX2</i>	182,9	20
	1552457_a_at	<i>ADAMTSL1</i>	67,8	19
	208491_s_at	<i>PGM5</i>	59,9	2
	240746_s_at	<i>LOC101927760</i>	49,1	11
	237974_at	NA	43,2	12
	227759_at	<i>PCSK9</i>	31,7	13
	206892_at	<i>AMHR2</i>	29,9	5
	224371_at	<i>ADAMTSL1</i>	23,8	4
	238533_at	<i>EPHA7</i>	22,1	16
SHH	228518_at	NA	121,9	1
	221336_at	<i>ATOH1</i>	30,9	3
	227629_at	<i>PRLR</i>	22,3	6
	1561027_at	<i>LOC646241</i>	19,6	20
	215104_at	<i>NRIP2</i>	19,1	2
	220429_at	<i>NDST3</i>	16,0	18
	239970_at	NA	12,3	12
	236977_at	<i>LOC646588</i>	11,8	14
Grupa 3	206841_at	<i>PDE6H</i>	678,5	10
	206597_at	<i>NRL</i>	214,2	3
	206596_s_at	<i>NRL</i>	102,9	1
	1554069_at	<i>EPHA8</i>	102,8	13
	236099_at	NA	47,5	17
	239317_at	NA	35,4	7
	220111_s_at	<i>ANO2</i>	29,4	4
	207080_s_at	<i>PYY</i>	24,9	11
	206047_at	<i>GNB3</i>	17,0	6
Grupa 4	1559213_at	<i>LINC01419</i>	3390,0	7
	231631_at	NA	10,0	5
	206536_s_at	<i>XIAP</i>	8,7	3
	242555_at	<i>C16orf87</i>	7,6	4
	235727_at	<i>KLHL28</i>	6,1	17
	226572_at	<i>SOCS7</i>	5,9	18
	234333_at	<i>KIAA2022</i>	5,2	1

Ze względu na brak dobrych kandydatów wykazujących wysoką ekspresję dla Grupy 4 *medulloblastoma* w przeprowadzonej analizie, zastosowano w kolejnych badaniach geny markerowe zidentyfikowane przez Northcott i wsp. 2012 [81] tzn. *KCNA1*, *SNCAIP*, *UNC5D*, *RBM24*, *KHDRBS2* i *CDH18*.

4.2.3. Geny markerowe dla CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1

Nowotwory CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1 występują głównie nadnamiotowo, dlatego nie znaleziono wystarczającej liczby guzów podnamiotowych do przeprowadzenia analiz w celu identyfikacji genów markerowych. Zamiast tego posłużono się genami markerowymi dla tych nowotworów, które zostały zidentyfikowane podczas analizy guzów nadnamiotowych i opisane w Tabeli 1 artykułu opublikowanego przez Łastowska i wsp. [82].

4.2.4. Podsumowanie analiz

Ostatecznie do analiz użyto zestawu genów znajdujących się w Tabeli 8. Podkreślone geny zostały dodatkowo włączone jako geny markerowe na podstawie danych literaturowych. Dla grup PFA i PFB *ependymoma* dodano po jednym genie markerowym według Witt i wsp. [12], tzn. *LAMA2* dla PFA i *NELL2* dla PFB, natomiast dla podgrup molekularnych PFA1 i PFA2 wybrano po dwa geny markerowe na podstawie Pajtler i wsp. [83]. Ponadto dla *medulloblastoma* i nowotworów CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1 wybrano geny na podstawie doniesień Northcott i wsp. [84] oraz własnej publikacji współautorskiej Łastowska i wsp. [27, 60].

Tabela 8. Wyselekcjonowane geny, które posłużyły do zaprojektowania sond molekularnych używanych w technologii NanoString.

Nowotwór	Skrót	Grupa molekularna	Podgrupa molekularna	Geny markerowe
<i>Ependymoma</i>	EPN	Markery EPN	-	<i>CAPS, ECM2, FAM81B</i>
		PFA	-	<i>ALDH1L1, CXorf67, IGSF1, LAMA2, SLC6A13</i>
			A1	<i>SKAP2, WIF1</i>
			A2	<i>CNPY1, EN2</i>
		PFB	-	<i>C9orf72, CEP83, DNAH1, NELL2, NXNL2</i>
MYC	-	<i>MYC</i>		
<i>Medulloblastoma</i>	MB	Markery MB	-	<i>ACTL6B, MYC, MYCN, NEUROD1, SSTR2</i>
		WNT	-	<i>ADAMTSL1, ALK, EMX2, EPHA7, PCSK9, PGM5, SHOX2, WIF2</i>
		SHH	-	<i>ATOH1, EYA1, HHIP, NDST3, NRIP2, PRLR</i>

		Grupa 3	-	<i>ANO2, <u>GABRA5</u>, <u>GNB3</u>, <u>IMPG2</u>, <u>MYCC</u>, <u>NPR3</u>, <u>NRL</u>, <u>PDC</u>, <u>PYY</u></i>
		Grupa 4	-	<i><u>KCNA1</u>, <u>KHDRBS2</u>, <u>MYCN</u>, <u>RBM24</u>, <u>SNCAIP</u>, <u>UNC5D</u></i>
CNS HGNET	HGNET	BCOR	-	<i><u>BCOR</u>, <u>MMP15</u>, <u>MNX1</u>, <u>RTN4RL1</u>, <u>SHISA8</u></i>
		MN1	-	<i><u>APCDD1L</u>, <u>BEND2</u>, <u>SHOX</u></i>
<i>Geny referencyjne: ACTB, GAPDH, LDHA, TBB, TBP</i>				

4.3. Analiza ekspresji genów przy użyciu technologii NanoString

Łącznie uzyskano 113 próbek RNA wyizolowanych z 7 typów nowotworów mózgu, występujących w lokalizacji podnamiotowej. Szczegółowe dane znajdują się w rozdziałach dotyczących poszczególnych analiz. Prezentacja różnic w ekspresji genów wyrażona jest w skali Log2.

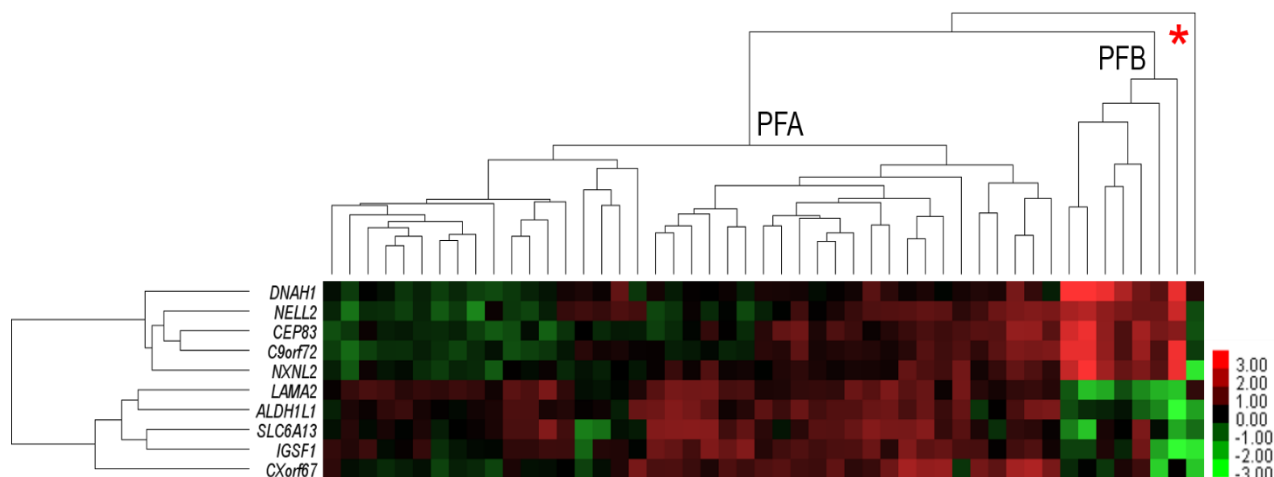
4.3.1. Ependymoma podnamiotowe – ustalenie przynależności do grupy molekularnej

W celu ustalenia przynależności do grupy molekularnej *ependymoma* wyizolowano w sumie 53 próbek RNA. Z eksperymentu wyłączono 4 próbki ze względu na złą ocenę jakości materiału. Ostatecznie hierarchicznej analizie skupień poddano 49 próbek *ependymoma* zlokalizowanych w tylnym dole czaszki. W celu ustalenia przynależności do grupy PFA lub PFB użyto zestawu 10 sond (Tabela 9).

Tabela 9. Geny markerowe użyte w hierarchicznej analizie skupień w celu identyfikacji poszczególnych grup molekularnych *ependymoma*.

Grupa molekularna	Wyselekcjonowane geny
PFA	<i>ALDH1L1, CXorf67, IGSF1, LAMA2, SLC6A13</i>
PFB	<i>C9orf72, CEP83, DNAH1, NELL2, NXNL2</i>

Hierarchiczna analiza skupień próbek *ependymoma* w lokalizacji podnamiotowej wykazała, że 41 próbek należy do grupy molekularnej PFA, siedem przypadków należy do grupy molekularnej PFB, a jedna próbka nie przynależy do żadnej z grup i tym samym została usunięta z dalszych analiz (Rycina 8).



Rycina 8. Hierarchiczna analiza skupień 49 próbek wykazała przynależność do jednej z dwóch grup molekularnych *ependymoma*. Czerwoną gwiazdką oznaczono próbkę nie przynależącą do żadnej z grup. Skala kolorów przedstawia różnice w Log2 ekspresji genów.

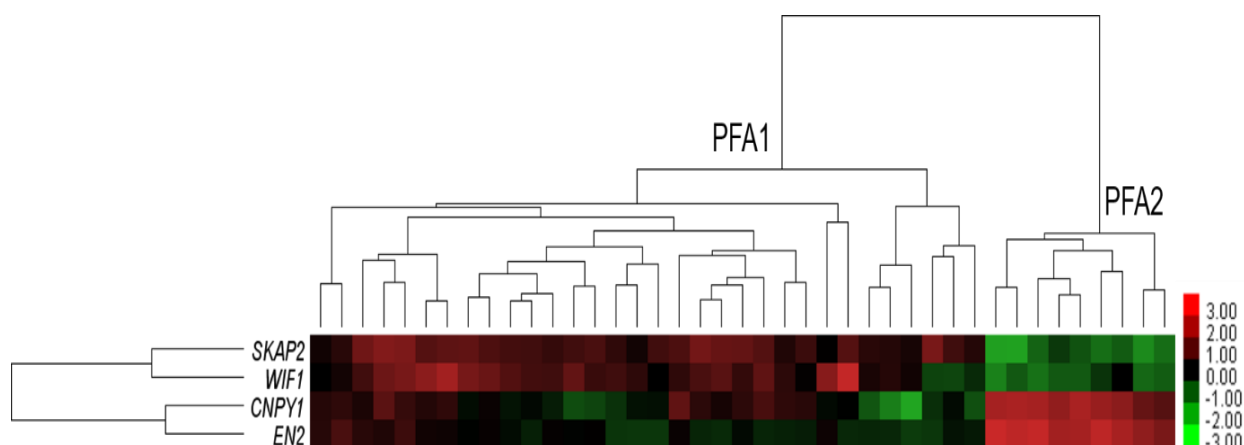
Heterogenność grupy molekularnej PFA

Po ustaleniu przynależności próbek do grupy molekularnej PFA wykonano ponownie hierarchiczną analizę skupień w celu identyfikacji podgrup, które mogłyby pomóc w dokładniejszej klasyfikacji pacjentów. Analizowano 41 próbki *ependymoma* PFA z użyciem czterech sond (Tabela 10), mających na celu zdefiniować podgrupę PFA1 i PFA2.

Tabela 10. Geny markerowe użyte w hierarchicznej analizie skupień w celu identyfikacji podgrup molekularnych *ependymoma* PFA.

Podgrupa molekularna	Wyselekcjonowane geny
PFA1	<i>SKAP2, WIF1</i>
PFA2	<i>CNPY1, EN2</i>

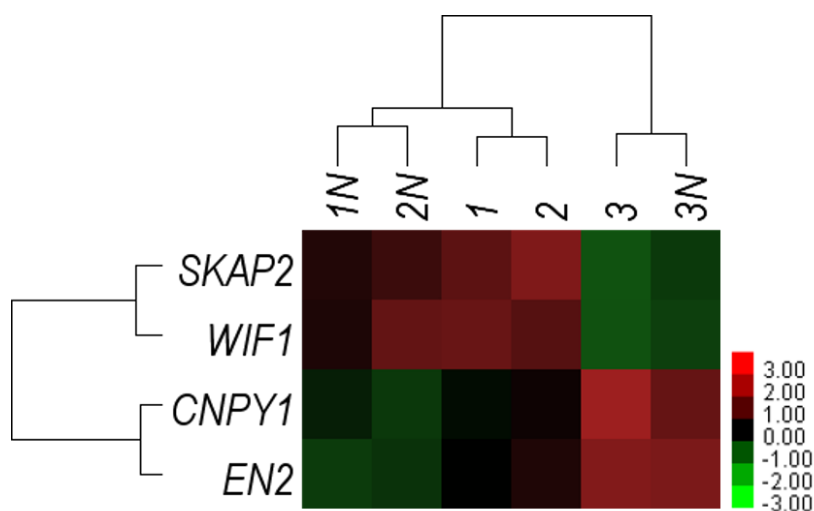
Po wykonaniu hierarchicznej analizy skupień próbek należących do podgrupy PFA z użyciem czterech sond wykazano, że grupa molekularna PFA jest heterogenna i składa się z dwóch podgrup. Wśród 41 próbek PFA, 32 przypadki grupowały się jako podgrupa molekularna PFA1, a pozostałe 9 należało do podgrupy molekularnej PFA2 (Rycina 9).



Rycina 9. Hierarchiczna analiza skupień 41 próbek PFA do jednej z dwóch podgrup molekularnych *ependymoma*. Skala kolorów przedstawia różnice w Log2 ekspresji genów.

Analiza przynależności do podgrup molekularnych guzów pierwotnych i wznowy

W bazie danych zidentyfikowano trzy przypadki nowotworów pierwotnych OUN (1, 2, 3), w których wystąpiła wznowa procesu nowotworowego (1N, 2N, 3N). Dało to możliwość sprawdzenia statusu podgrupy molekularnej w momencie wznowy nowotworu.



Rycina 10. Hierarchiczna analiza skupień 6 próbek do jednej z dwóch podgrup molekularnych *ependymoma*. Skala kolorów przedstawia różnice w Log2 ekspresji genów. 1, 2, 3 - guz pierwotny. 1N,2N,3N - wznowa.

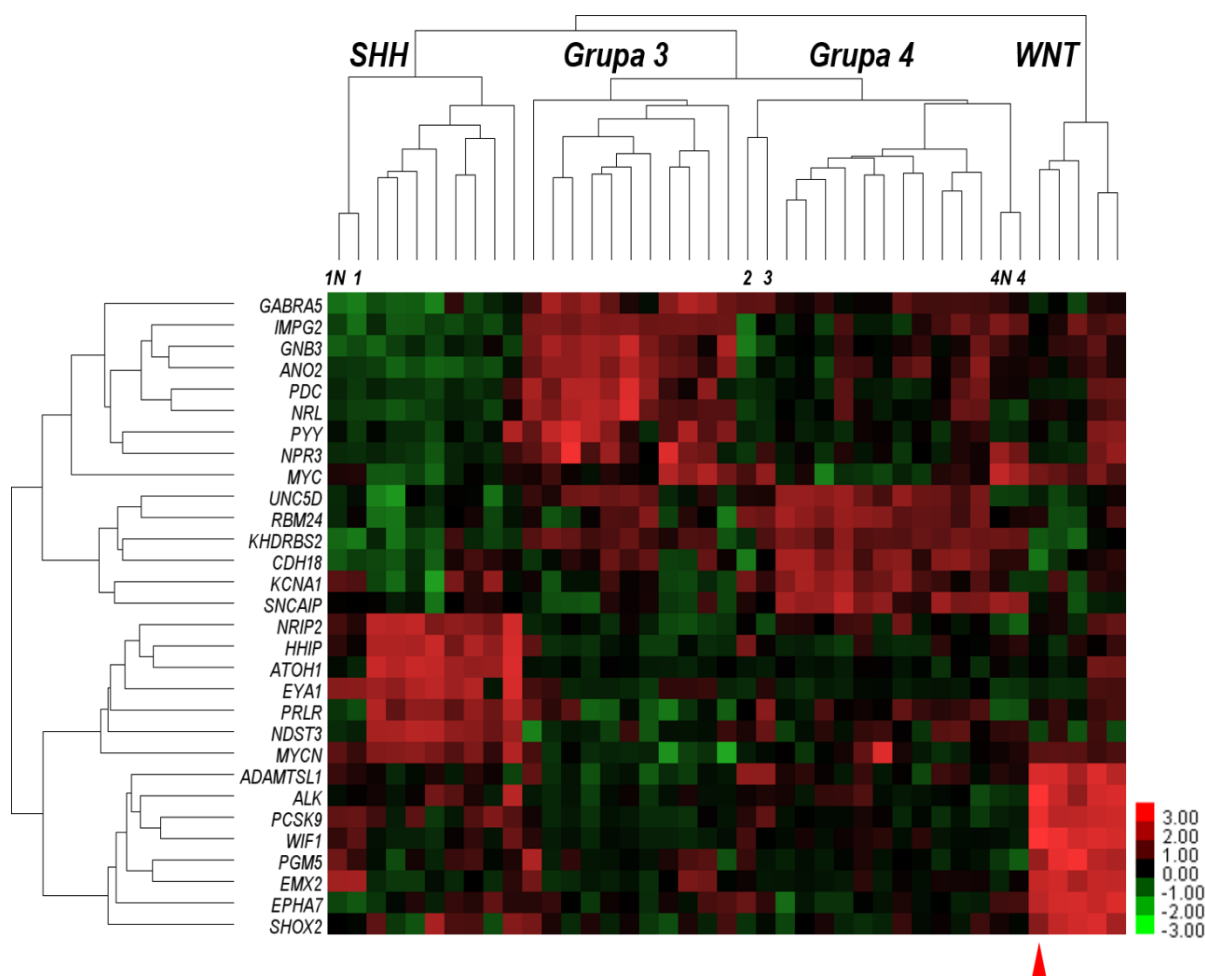
Po wykonaniu hierarchicznej analizy skupień próbek wszystkie nowotwory pierwotne oraz ich wznowy utrzymały status podgrupy molekularnej PFA1 bądź PFA2 (Rycina 10).

4.3.2. *Medulloblastoma* – ustalenie przynależności do grupy molekularnej

Poniższa analiza obejmowała 41 guzów zdiagnozowanych jako *medulloblastoma*, w tym dwa przypadki wznowy nowotworu. W celu ustalenia przynależności do grupy WNT, SHH, Grupy 3 i Grupy 4 użyto zestawu 29 sond (Tabela 11). Zestaw zawierał sondy dla genów markerowych dla poszczególnych grup, wyselekcjonowanych w niniejszej pracy oraz genów opublikowanych uprzednio przez Northcott i wsp. [81] i przedstawionych we współautorskiej pracy przez Łastowska i wsp. [27], (podkreślone w Tabeli 11). Dodatkowo użyto sondy dla onkogenu *MYCN*, charakterystycznego dla Grupy 4. Wobec rzadkiego występowania *medulloblastoma* z grupy transkrypcyjnej WNT (ok. 10%), do analizy metodą NanoString włączono 1 guz referencyjny, w którym w ramach badań diagnostycznych wykryto uprzednio mutację w genie *CTNNB1*. Zapewniło to obecność reprezentatywnego guza z grupy WNT w analizowanej serii.

Tabela 11. Geny markerowe użyte w hierarchicznej analizie skupień w celu identyfikacji poszczególnych grup molekularnych *medulloblastoma*.

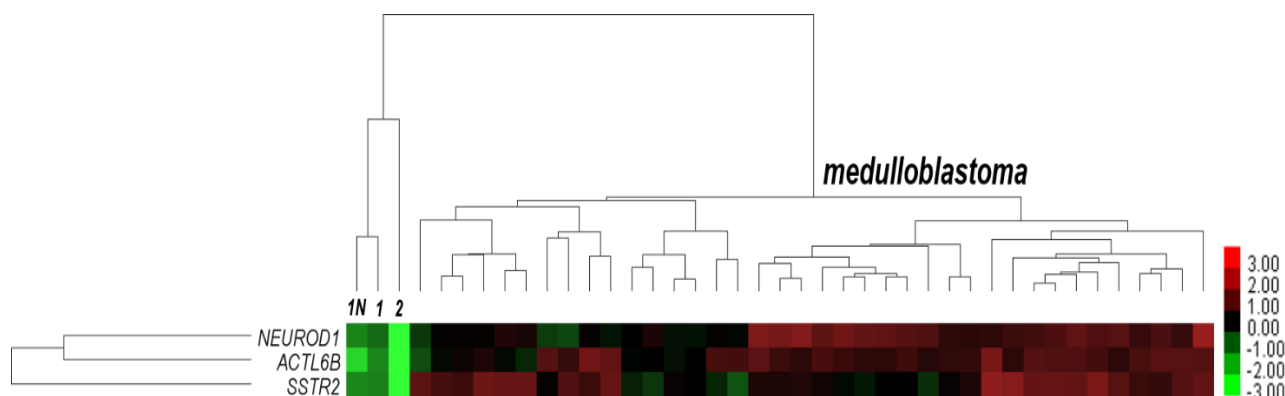
Grupa molekularna	Wyselekcjonowane geny
WNT	<i>ADAMTSL1</i> , <u><i>ALK</i></u> , <u><i>EMX2</i></u> , <i>EPHA7</i> , <i>PCSK9</i> , <i>PGM5</i> , <i>SHOX2</i> , <u><i>WIF2</i></u>
SHH	<i>ATOH1</i> , <u><i>EYA1</i></u> , <u><i>HHIP</i></u> , <i>NDST3</i> , <i>NRIP2</i> , <i>PRLR</i>
Grupa 3	<i>ANO2</i> , <u><i>GABRA5</i></u> , <i>GNB3</i> , <u><i>IMPG2</i></u> , <u><i>MYCC</i></u> , <u><i>NPR3</i></u> , <i>NRL</i> , <u><i>PDC</i></u> , <i>PYY</i>
Grupa 4	<u><i>KCNA1</i></u> , <u><i>KHDRBS2</i></u> , <u><i>MYCN</i></u> , <u><i>RBM24</i></u> , <u><i>SNCAIP</i></u> , <u><i>UNC5D</i></u>



Rycina 11. Hierarchiczna analiza skupień 41 próbek do jednej z czterech grup molekularnych *medulloblastoma*. Czerwoną strzałką oznaczono próbkę referencyjną dla grupy transkrypcyjnej WNT. Skala kolorów przedstawia różnice w Log2 ekspresji genów.

Po wykonaniu hierarchicznej analizy skupień próbek zidentyfikowano wszystkie cztery grupy molekularne *medulloblastoma* (Rycina 11). Ostatecznie, do grupy transkrypcyjnej WNT zaliczono 5 guzów, do grupy transkrypcyjnej SHH zaliczono 8 guzów, do Grupy 3 zaliczono 11 guzów, do Grupy 4 zaliczono 11 guzów. Ponadto dwa nowotwory (Rycina 11, próbka 1 i 1N) i kolejne cztery guzy nie wykazywały przynależności do czterech podstawowych grup molekularnych. W związku z tym, nowotwory 1, 1N, 2, 3, 4, 4N uznano jako niesklasyfikowane. Próbkę 1 i 1N oraz 4 i 4N pobrane w trakcie diagnozy (1, 4) i nawrotu choroby (1N, 4N) wykazują podobny profil ekspresji genów w przypadku guza pierwotnego i wznowy.

Ze względu na to, że obecność niesklasyfikowanych guzów mogła sugerować ich przynależność do innych nowotworów niż *medulloblastoma*, przeprowadzono kolejną hierarchiczną analizę skupień powyższych 41 guzów, używając trzech sond markerowych dla całej grupy *medulloblastoma*, tzn. *SSTR2*, *NEUROD1* i *ACTL6B* (Rycina 12).



Rycina 12. Hierarchiczna analiza skupień 41 próbek w celu potwierdzenia diagnozy *medulloblastoma*. Skala kolorów przedstawia różnice w Log2 ekspresji genów.

Wyniki wykazały, że trzy niesklasyfikowane guzy (1, 1N i 2) nie wykazały ekspresji genów markerowych *medulloblastoma*, co potwierdziło przypuszczenie, że nowotwory te mogą reprezentować inny rodzaj nowotworu. Wszystkie pozostałe guzy wykazały obecność ekspresji genów markerowych, potwierdzając tym samym rozpoznanie rdzeniaka.

4.3.3. Nowotwory CNS HGNET

Ponieważ w wynikach analiz przedstawionych na Rycinach 11 i 12 znalazły się trzy guzy niesklasyfikowane, uznano za zasadne przeprowadzenie dodatkowych analiz z guzami innymi niż *medulloblastoma*, w celu potencjalnego wykrycia rzadkich i trudnych do zdiagnozowania kategorii guzów.

Zbiór tkanek zawierał trzy nowotwory, które były już uprzednio zakwalifikowane na podstawie analizy profilu metylacji genów jako CNS HGNET-BCOR (dwa guzy) oraz CNS HGNET-MN1 (jeden guz) według Sturm i wsp. [56]. Te trzy guzy zostały użyte jako próbki referencyjne, gdyż grupujące się z nimi inne próbki będą wskazywały na taką samą diagnozę.

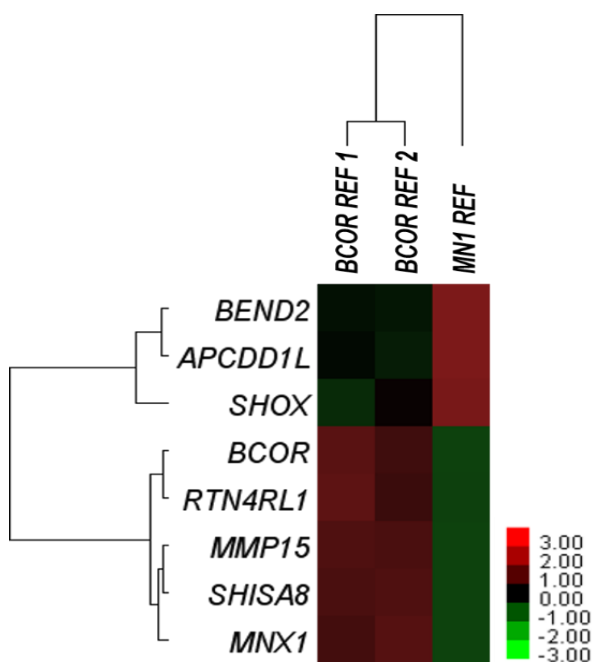
CNS HGNET-BCOR vs. CNS HGNET-MN1

Jak zaznaczono w podrozdziale 5.2.3, do identyfikacji podnamiotowych nowotworów CNS HGNET-BCOR oraz CNS HGNET-MN1 użyto sond zidentyfikowanych podczas analizy guzów nadnamiotowych, które wymienione są w poniższej Tabeli 12.

Tabela 12: Geny markerowe użyte w hierarchicznej analizie skupień w celu identyfikacji CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1.

Grupa molekularna	Wyselekcjonowane geny markerowe
CNS HGNET-BCOR	<i>BCOR, MMP15, MNX1, RTN4RL1, SHISA8</i>
CNS HGNET-MN1	<i>APCDD1L, BEND2, SHOX</i>

We wstępnej analizie użyto tylko trzech guzów referencyjnych, aby sprawdzić, czy hierarchiczna analiza skupień w programie nSolver przy pomocy wymienionych sond pozwoli na takie same rozróżnienie tych guzów. Analizowano dwa nowotwory o diagnozie CNS HGNET-BCOR oraz jeden nowotwór o diagnozie CNS HGNET-MN1, stosując zestaw 8 wymienionych wyżej sond (Rycina 13).



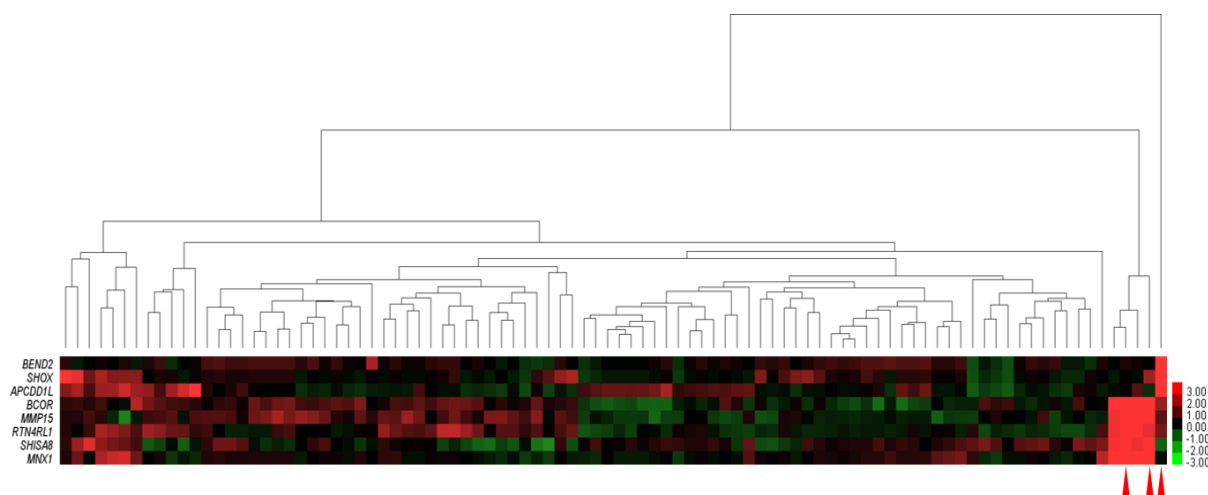
Rycina 13. Hierarchiczna analiza skupień trzech guzów referencyjnych. Skala kolorów przedstawia różnice w Log2 ekspresji genów.

Stosując hierarchiczną analizę skupień próbek wykazano, że za pomocą wybranych sond można odróżnić grupę molekularną CNS HGNET-BCOR od CNS HGNET-MN1.

Próbka identyfikacja nowotworów CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1

Wykonano hierarchiczną analizę skupień przy użyciu 8 sond w grupie 91 podnamiotowych guzów mózgu oraz 3 guzów referencyjnych dla grupy CNS HGNET. W grupie 91 guzów podnamiotowych analizowano 48 przypadków *ependymoma*, 36 przypadków *medulloblastoma*, jeden przypadek glejaka o wysokim stopniu złośliwości, 2 przypadki AT/RT

i 4 przypadki CPC. W wyniku analizy (Rycina 14), oprócz guzów referencyjnych, zidentyfikowano dwa nowe przypadki guzów wykazujące profil ekspresji genów CNS HGNET-BCOR, jeden guz oznaczony BCOR-M, uprzednio rozpoznany jako *medulloblastoma* i drugi oznaczony BCOR-G, rozpoznany pierwotnie jako glejak o wysokim stopniu złośliwości. Nie zidentyfikowano natomiast żadnego nowego guza wykazującego profil ekspresji genów CNS HGNET-MN1.



Rycina 14. Hierarchiczna analiza skupień 3 guzów referencyjnych (czerwona strzałka) i 91 badanych guzów podnamiotowych. Czerwone strzałki wskazują na dwa guzy referencyjne dla grupy CNS HGNET-BCOR i jeden dla grupy CNS HGNET-MN1. W analizowanej serii guzów zidentyfikowano dwa guzy o wysokiej ekspresji sygnatury genowej dla CNS HGNET-BCOR. Skala kolorów przedstawia różnice w Log2 ekspresji genów.

W celu potwierdzenia, że wykryte dwa nowe przypadki CNS HGNET-BCOR wykazują odmienną diagnozę niż *medulloblastoma* i glejak o wysokim stopniu złośliwości, przeprowadzono dodatkowe analizy profilowania ekspresji genów.

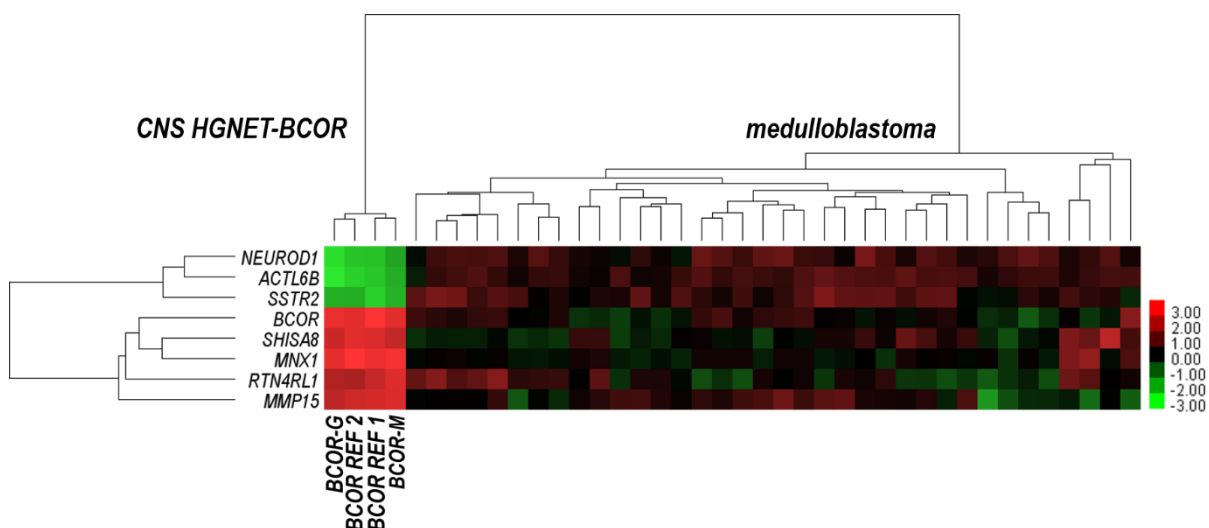
CNS HGNET-BCOR vs. *medulloblastoma*

Do analizy ekspresji genów użyto cztery guzy wykazujące profil CNS HGNET-BCOR (dwa guzy referencyjne i dwa nowo rozpoznane guzy BCOR-M i BCOR-G) oraz 36 przypadków z rozpoznaniem *medulloblastoma*. Hierarchiczną analizę skupień wykonano przy użyciu 8 sond, pięciu sond dla identyfikacji CNS HGNET-BCOR i trzech sond markerowych dla *medulloblastoma* (Tabela 13).

Tabela 13: Geny markerowe użyte w hierarchicznej analizie skupień w celu identyfikacji CNS HGNET-BCOR i *medulloblastoma*.

Nowotwór	Wyselekcjonowane geny
CNS HGNET-BCOR	<i>BCOR, MMP15, MNX1, RTN4RL1, SHISA8</i>
<i>medulloblastoma</i>	<i>ACTL6, NEUROD1, SSTR2</i>

Hierarchiczna analiza skupień wykazała dwa klastry, w tym klaster z ekspresją genów o profilu CNS HGNET-BCOR, ale z brakiem ekspresji genów markerowych dla *medulloblastoma* (Rycina 15). Zawierał on guz BCOR-M, rozpoznany uprzednio jako *medulloblastoma*, jak również próbkę BCOR-G. Próbkę BCOR-M jest tożsamy z próbką oznaczoną w poprzedniej analizie jako numer 2 (Rycina 11, Rycina 12). Potwierdza to, że profil molekularny tego guza odpowiada rozpoznaniu CNS HGNET-BCOR, nie jest to więc *medulloblastoma*.



Rycina 15. Hierarchiczna analiza skupień 36 próbek *medulloblastoma*, dwóch próbek referencyjnych CNS HGNET-BCOR i dwóch nowo sklasyfikowanych próbek BCOR-G i BCOR-M. Skala kolorów przedstawia różnice w Log2 ekspresji genów.

CNS HGNET-BCOR vs. glejaki

Wykonano dodatkowe analizy w celu potwierdzenia, że guz zdiagnozowany uprzednio jako HGG, a zidentyfikowany w analizie NanoString jako CNS HGNET-BCOR, nie należy do glejaków. By przeprowadzić hierarchiczną analizę skupień wykonano ponowną analizę plików CEL w celu identyfikacji genów markerowych dla glejaków. Analizowano tylko rozlane glejaki linii środkowej H3 K27-*altered*, gdyż glejaki z grupy molekularnej H3 G34-*mutant* nie występują w lokalizacji podnamiotowej. Dlatego porównano 32 glejaków z bazy GSE73038 do 199 pozostałych podnamiotowych nowotworów OUN, co pozwoliło na uzyskanie 20 najbardziej znamienych kandydatów na geny markerowe, wśród których

4 odznaczało się wysokim poziomem ekspresji i zostało wybrane dla przygotowania sond i analizy nCounter (Tabela 14).

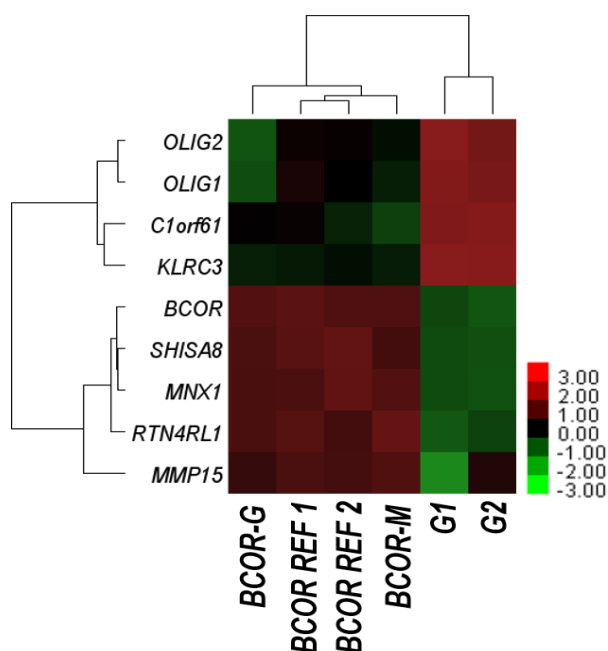
Tabela 14. Geny markerowe dla glejaka linii środkowej H3 K27-altered.

Grupa	Sonda	Nazwa genu	Średnia krotność zmiany ekspresji genów	Pozycja znamienności statystycznej
rozlany glejak linii środkowej H3 K27-altered	206785_s_at	NA	129,2	3
	207723_s_at	<i>KLRC3</i>	72,9	2
	213825_at	<i>OLIG2</i>	40,6	8
	233562_at	<i>LINC00839</i>	38,7	18
	210690_at	<i>KLRC4</i>	29,0	1
	230463_at	NA	19,9	7
	228170_at	<i>OLIG1</i>	16,6	20
	233051_at	<i>SLITRK2</i>	13,9	16
	222301_at	<i>C1orf61</i>	8,9	5
1559402_a_at	<i>C1orf61</i>	7,6	10	

Podobnie jak w poprzednich analizach do hierarchicznej analizy skupień użyto czterech guzów wykazujących profil CNS HGNET-BCOR (dwa guzy referencyjne i dwa nowo rozpoznane guzy BCOR-M i BCOR-G) oraz dwa dodatkowe guzy referencyjne glejaków, oznaczone w analizie jako G1 i G2. Analizę wykonano przy użyciu 9 sond, pięciu sond dla identyfikacji CNS HGNET-BCOR i czterech sond markerowych dla glejaków (Tabela 15, Rycina 16).

Tabela 15: Geny markerowe użyte w hierarchicznej analizie skupień w celu identyfikacji CNS HGNET-BCOR i glejaka.

Nowotwór	Wyselekcjonowane geny markerowe
CNS HGNET-BCOR	<i>BCOR, MMP15, MNX1, RTN4RL1, SHISA8</i>
glejak	<i>C1orf61, KLRC3, OLIG1, OLIG2</i>



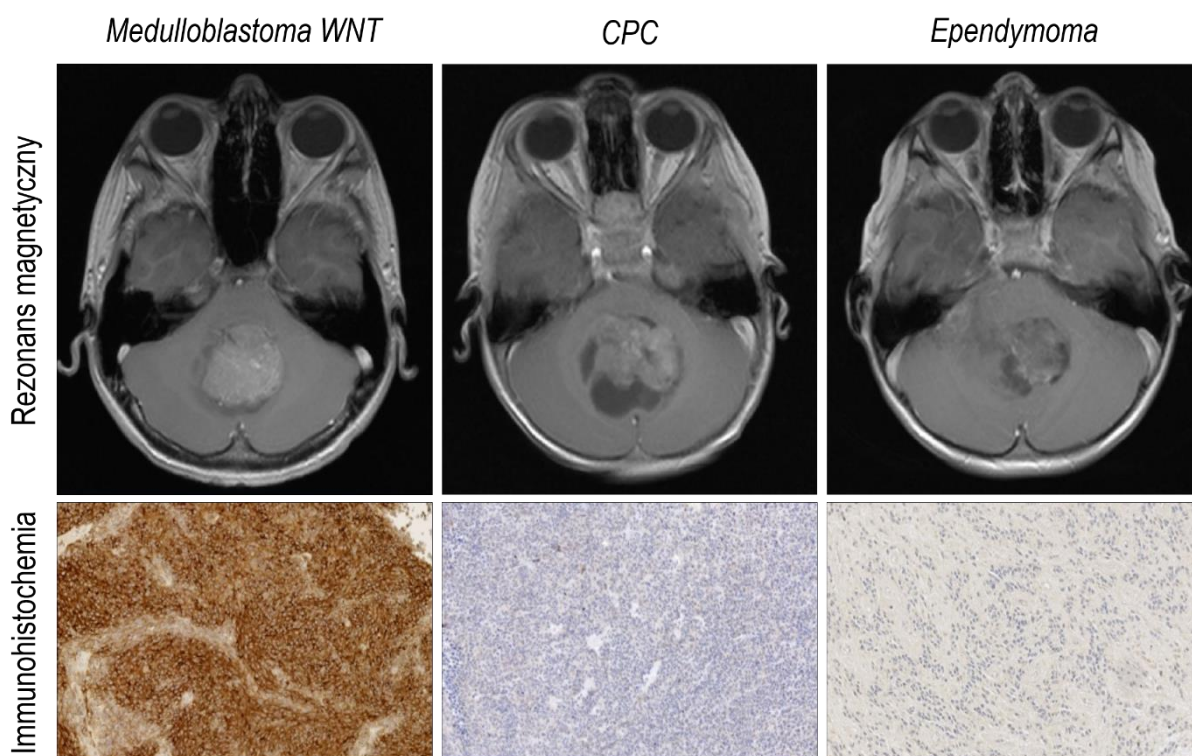
Rycina 16. Hierarchiczna analiza skupień czterech próbek CNS HGNET-BCOR oraz dwóch próbek referencyjnych nowotworów pochodzenia glejowego (G1, G2). Skala kolorów przedstawia różnice w Log2 ekspresji genów.

Klaster czterech próbek z ekspresją genów o profilu CNS HGNET-BCOR, ale brakiem ekspresji genów markerowych dla glejaków, zawierał guz rozpoznany uprzednio jako glejak o wysokim stopniu złośliwości (BCOR-G) i *medulloblastoma* (BCOR-M). Potwierdza to, że profil molekularny tych guzów odpowiada rozpoznaniu CNS HGNET-BCOR, nie są to więc również nowotwory pochodzenia glejowego.

4.4. Analiza immunohistochemiczna

4.4.1. Barwienie immunohistochemiczne w celu wykrycia ekspresji białka ALK

Uprzednio wykazano, że obecność ekspresji białka ALK jest markerem dla grupy transkrypcyjnej WNT *medulloblastoma*. W przedstawionej analizie zbadano, czy ekspresja białka ALK może być pomocnym markerem w diagnostyce różnicowej WNT *medulloblastoma* i innych guzów występujących o lokalizacji podnamiotowej. Materiałem porównawczym w badaniach immunohistochemicznych był rak splotu naczyniówkowego (CPC) i wyściółczak podnamiotowy.

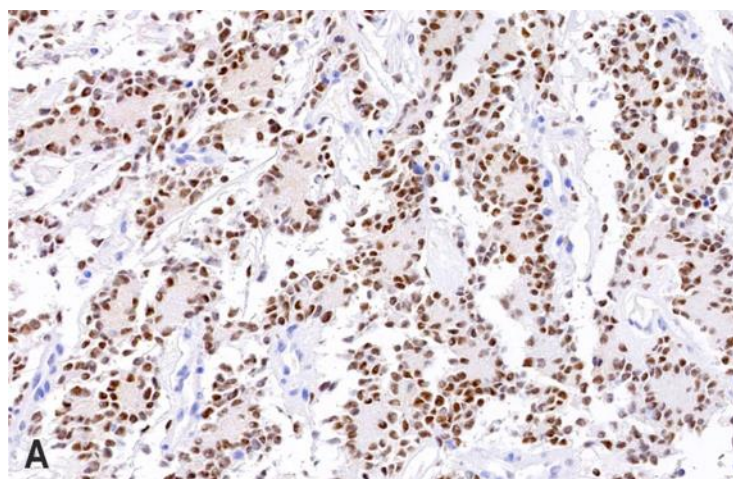


Rycina 17. Barwienie immunohistochemiczne białka ALK w przykładowych preparatach guzów grupy transkrypcyjnej WNT *medulloblastoma*, *choroid plexus carcinoma* (CPC) i *ependymoma*. Immunoekspresję ALK wykazuje tylko *medulloblastoma* grupy WNT. Preparaty zostały zeskanowane w oryginalnym powiększeniu 40x, powiększenie cyfrowe wynosiło 20x.

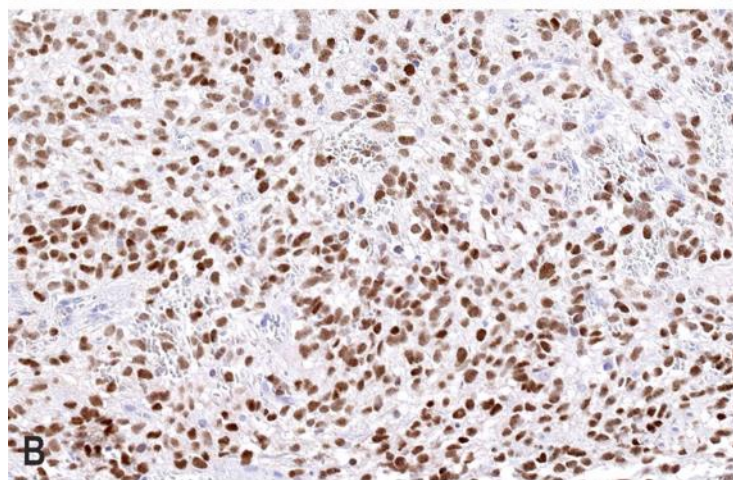
Analiza immunohistochemiczna przeprowadzona na 23 preparatach *medulloblastoma*, w tym 4 preparatach *medulloblastoma* grupy transkrypcyjnej WNT, 19 preparatach *ependymoma* i 5 preparatach CPC wykazała obecność ekspresji białka ALK w >50% komórek w WNT *medulloblastoma* oraz brak ekspresji w preparatach raka splotu naczyniówkowego, wściółczaka i innych grup molekularnych *medulloblastoma* (Rycina 17).

4.4.2. Barwienie immunohistochemiczne w celu wykrycia ekspresji białka BCOR

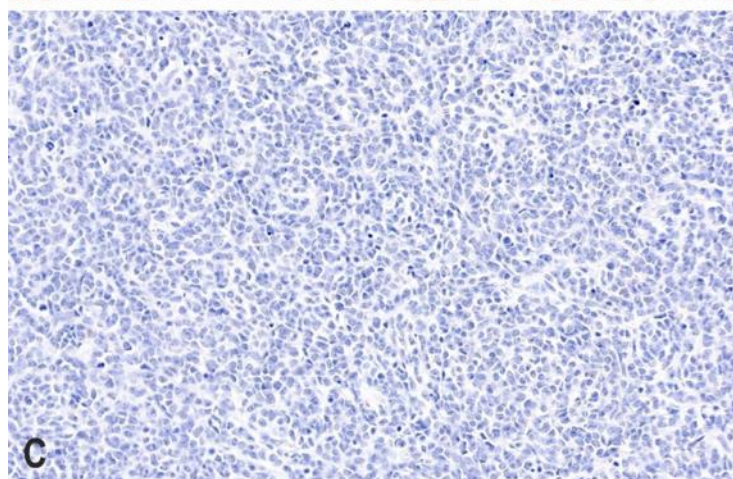
Obydwa guzy zidentyfikowane w trakcie analizy nCounter jako CNS HGNET-BCOR (HGNET-BCOR-M i HGNET-BCOR-G) wykazały obecność ekspresji genu *BCOR* na poziomie RNA. Wykonano analizę immunohistochemiczną w celu potwierdzenia obecności ekspresji BCOR na poziomie białka. Obydwa guzy wykazały pozytywną jądrową ekspresję BCOR, w przeciwieństwie do braku immunoekspresji w kontrolnym preparacie *medulloblastoma* (Rycina 18).



HGNET-BCOR-M



HGNET-BCOR-G



medulloblastoma

Rycina 18. Barwienie immunohistochemiczne ekspresji białka BCOR.

A – Jądrowa immunoekspresja BCOR w HGNET-BCOR-M

B – Jądrowa immunoekspresja BCOR w HGNET-BCOR-G

C – Brak ekspresji BCOR w *medulloblastoma*

Preparaty HGNET-BCOR zostały zeskanowane w oryginalnym powiększeniu 20x, preparat kontroli *medulloblastoma* 10x.

4.5. Korelacje biologiczno-kliniczne

W kolejnym etapie badań dokonano zestawienia wyników analiz ekspresji genów z danymi klinicznymi pacjentów w celu ustalenia korelacji kliniczno-patomorfologicznych. Wszyscy pacjenci byli leczeni według jednolitych protokołów terapeutycznych, ustalonych przez Polską Grupę ds. Neuroonkologii Dziecięcej (*The Polish Pediatric Neurooncology Group*, PPNG), co gwarantuje wiarygodność wyników dotyczących analizy przeżycia pacjentów.

4.5.1. Charakterystyka kliniczna *ependymoma*

Analiza przy użyciu metody nCounter wykazała przynależność 42 przypadków *ependymoma* do grupy PFA i 7 do grupy PFB. Ponadto wśród grupy PFA wydzielono podgrupę PFA1 (32 guzy) oraz PFA2 liczbą (9 guzów). Charakterystykę kliniczną dla poszczególnych pacjentów przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Dane kliniczne pacjentów z rozpoznaniem *ependymoma*.

ID	Grupa wg NanoString	Płeć	Wiek	Stopień wg WHO	Przerzuty	Wznowa	Zgon	PFS [miesiąc]	OS [miesiąc]
1	PFA1	K	3	3	nie	tak	tak	7	74
2	PFA1	K	1	3	nie	tak	tak	9	24
3	PFA1	K	3	2	nie	tak	tak	4	12
4	PFA1	M	2	3	nie	tak	tak	57	69
5	PFA1	M	0,5	3	nie	tak	tak	31	31
6	PFA1	K	1	3	nie	tak	tak	21	50
7	PFA1	M	3	2	nie	tak	tak	21	22
8	PFA1	M	4	2	nie	nie	-	-	-
9	PFA1	M	0,5	2	tak	nie	-	-	-
10	PFA1	M	5	3	nie	tak	tak	26	38
11	PFA1	M	1	3	tak	tak	tak	44	100
12	PFA1	M	5	3	nie	tak	tak	21	24
13	PFA1	M	1	3	tak	nie	-	-	-
14	PFA1	K	1	3	nie	tak	nie	7	96
15	PFA1	M	2	2	nie	tak	nie	41	108
16	PFA1	K	1	2	nie	tak	nie	5	72
17	PFA1	M	2	3	nie	nie	nie	120	120
18	PFA1	M	5	3	nie	nie	nie	38	38
19	PFA1	M	2	3	nie	nie	nie	46	46
20	PFA1	K	2	2	nie	tak	nie	9	84
21	PFA1	M	2	3	nie	tak	tak	9	38
22	PFA1	M	3	-	nie	nie	-	-	-
23	PFA1	M	13	3	nie	tak	tak	26	62
24	PFA1	M	10	3	nie	tak	tak	11	19
25	PFA1	M	4	2	nie	tak	tak	18	35
26	PFA1	K	4	3	nie	tak	nie	40	228
27	PFA1	K	3	3	nie	nie	nie	150	150
28	PFA1	K	5	3	nie	nie	nie	156	156

29	PFA1	M	5	3	nie	nie	nie	30	30
30	PFA1	K	8	3	nie	tak	nie	11	23
31	PFA1	K	9	2	nie	nie	nie	180	180
32	PFA1	K	5	3	nie	tak	tak	108	108
33	PFA2	M	0,5	3	nie	tak	tak	16	16
34	PFA2	M	2	3	nie	tak	tak	34	41
35	PFA2	M	1	3	nie	tak	tak	9	78
36	PFA2	M	0,5	3	nie	tak	tak	28	67
37	PFA2	M	3	3	nie	tak	tak	56	58
38	PFA2	M	2	2	nie	tak	nie	24	132
39	PFA2	M	3	2	nie	nie	nie	72	72
40	PFA2	M	11	2	-	nie	nie	84	84
41	PFA2	M	10	2	nie	nie	nie	28	28
42	PFB	M	8	3	tak	nie	nie	192	192
43	PFB	K	13	2	nie	nie	nie	108	108
44	PFB	M	4	3	nie	nie	nie	204	204
45	PFB	M	11	3	nie	nie	nie	192	192
46	PFB	M	9	2	nie	nie	nie	84	84
47	PFB	M	7	2	nie	nie	nie	48	48
48	PFB	K	6	2	nie	nie	tak	-	-

M – płeć męska; K – płeć żeńska; OS - przeżycie całkowite, ang. *overall survival*; PFS - przeżycie wolne od progresji choroby, ang. *progression-free survival*;

Symbol myślnika oznacza brak danych. Pacjenci o identyfikatorze 8, 9, 13, 22 i 47 zostali usunięci z analizy krzywych przeżycia wg Kaplana-Meiera ze względu na zgon niezwiązany z chorobą nowotworową bądź brak informacji o pacjencie.

Charakterystyka kliniczna grup molekularnych PFA i PFB

Wiek pacjentów. Średnia wieku w czasie diagnozy dla pacjentów z grupy molekularnej PFA wynosi 3,6 lat, a dla pacjentów z grupy molekularnej PFB wynosi 8,3 lat (Tabela 17). Aby sprawdzić równość wariancji wykonano test Levene’a, a następnie odczytano poziom istotności testu t-Studenta dla prób niezależnych. Wynik testu Levene’a wynosi 0,962 i wskazuje na homogeniczność wariancji. Wynik testu t-Studenta wynosi $p = 0,001$ i wskazuje, że wiek pacjentów w grupie PFA jest znacząco niższy niż w grupie PFB.

Tabela 17. Wiek pacjentów z grup molekularnych *ependymoma*.

Grupa molekularna	Liczba pacjentów	Średnia wieku	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej
PFA	41	3,6	3,140	0,490
PFB	7	8,3	3,039	1,149

Płeć pacjenta, stopień wg WHO guza, obecność przerzutów. Nie wykazano korelacji pomiędzy przynależnością do grup molekularnych a płcią pacjenta (Tabela 18), stopniem agresywności nowotworu według WHO (Tabela 19) oraz obecnością przerzutów (Tabela 20).

Tabela 18. Grupa molekularna *ependymoma* i płeć pacjenta.

Płeć	PFA	PFB	<i>Ogółem</i>	Test Fishera
Dziewczęta	13	2	15	p = 1 istotność dwustronna p = 0,622 istotność jednostronna
Chłopcy	28	5	33	
<i>Ogółem</i>	41	7	48	

Tabela 19. Grupa molekularna *ependymoma* i stopień agresywności nowotworu wg WHO.

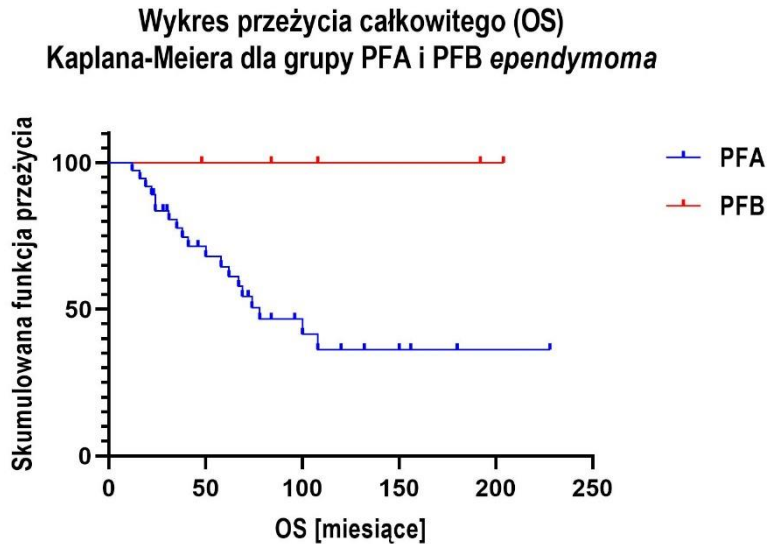
WHO	PFA	PFB	<i>Ogółem</i>	Test Fishera
2	13	4	17	p = 0,235 istotność dwustronna p = 0,203 istotność jednostronna
3	27	3	30	
<i>Ogółem</i>	40	7	47	

Tabela 20. Grupa molekularna *ependymoma* i obecność przerzutów.

Przerzuty	PFA	PFB	<i>Ogółem</i>	Test Fishera
Tak	3	1	4	p = 0,488 istotność dwustronna p = 0,488 istotność jednostronna
Nie	37	6	43	
<i>Ogółem</i>	40	7	47	

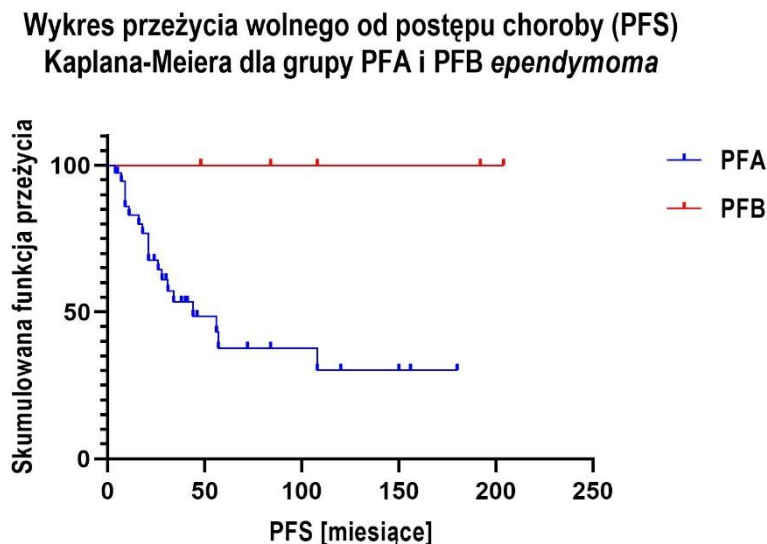
Analiza przeżycia wg Kaplana-Meiera

Wykonano analizę przeżycia OS oraz PFS dla pacjentów z grupy PFA i PFB (Rycina 19, Rycina 20).



Rycina 19. Krzywa OS wg Kaplana-Meiera dla grup molekularnych PFA i PFB. Poziom istotności Log Rank (Mantel-Cox) wynosi 0,026.

Wniosek: Pacjenci z grupy molekularnej PFA mają znamienne gorsze szanse na przeżycie niż pacjenci z grupy PFB.



Rycina 20. Krzywa PFS wg Kaplana-Meiera dla grup molekularnych PFA i PFB. Poziom istotności Log Rank (Mantel-Cox) wynosi 0,013.

Wniosek: Pacjenci z grupy molekularnej PFA mają znamienne gorsze szanse na przeżycie wolne od wznowy choroby niż pacjenci z grupy PFB.

Charakterystyka kliniczna podgrup molekularnych PFA1 i PFA2

Wiek pacjentów. Średnia wieku w czasie diagnozy dla pacjentów z podgrupy molekularnej PFA1 wynosi 3,8 lat a w przypadku podgrupy PFA2 wynosi 2,8 lat (Tabela 21). Aby sprawdzić równość wariancji wykonano test Levene'a, a następnie odczytano poziom istotności testu t-Studenta dla prób niezależnych. Wynik testu Levene'a wynosi 0,094 i wskazuje na homogeniczność wariancji. Wynik testu t-Studenta wynosi $p = 0,460$ i wskazuje, że wiek pacjentów w grupie PFA1 i PFA2 nie różni się istotnie statystycznie.

Tabela 21. Wiek pacjentów z podgrup molekularnych *ependymoma*.

Podgrupa molekularna	Liczba pacjentów	Średnia wieku	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej
PFA1	32	3,6	2,935	0,519
PFA2	8	2,8	3,093	1,094

Płeć pacjenta, stopień złośliwości histopatologicznej wg WHO, obecność przerzutów

W analizowanej serii pacjentów grupa PFA2 składała się wyłącznie z pacjentów płci męskiej, co miało wpływ na znamieny wynik analizy statystycznej (Tabela 22). Natomiast nie wykazano korelacji pomiędzy przynależnością do podgrup molekularnych a stopniem agresywności nowotworu według WHO (Tabela 23) i obecnością przerzutów (Tabela 24).

Tabela 22. Podgrupa molekularna *ependymoma* i płeć pacjenta.

Płeć	PFA1	PFA2	Ogółem	Test Fishera
Dziewczeta	13	0	13	$p = 0,037$ istotność dwustronna $p = 0,029$ istotność jednostronna
Chłopcy	19	8	27	
Ogółem	32	8	40	

Tabela 23. Podgrupa molekularna *ependymoma* i stopień agresywności nowotworu wg WHO.

WHO	PFA1	PFA2	Ogółem	Test Fishera
2	9	3	12	$p = 0,682$ istotność dwustronna $p = 0,473$ istotność jednostronna
3	22	5	27	
Ogółem	31	8	39	

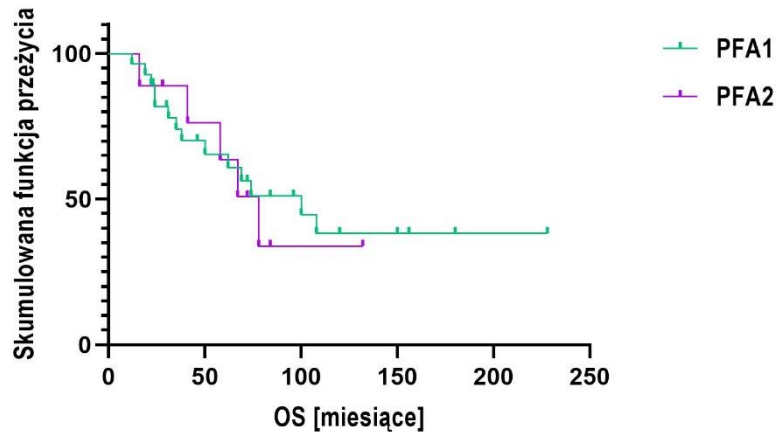
Tabela 24. Podgrupa molekularna *ependymoma* i obecność przerzutów.

Przerzuty	PFA	PFB	Ogółem	Test Fishera
Tak	29	8	37	$p = 1,0$ istotność dwustronna $p = 0,502$ istotność jednostronna
Nie	3	0	3	
Ogółem	32	8	40	

Analiza przeżycia wg Kaplana-Meiera

Wykonano analizę przeżycia OS oraz PFS dla pacjentów z grupy PFA1 i PFA2 (Rycina 21, Rycina 22).

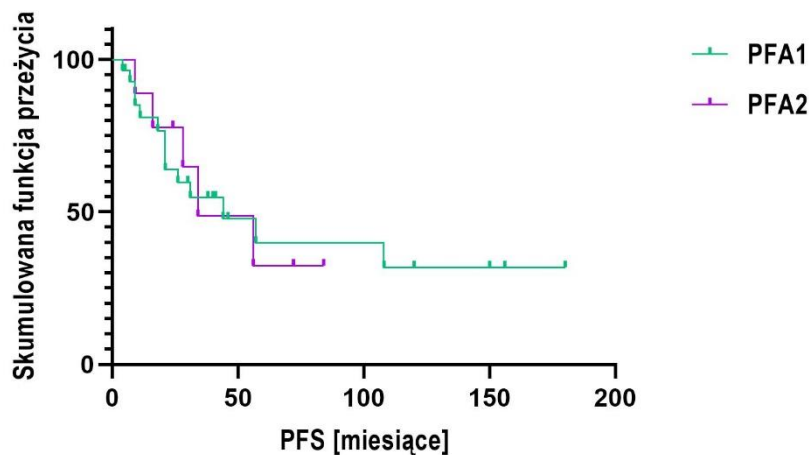
Wykres przeżycia całkowitego (OS)
Kaplana-Meiera dla podgrupy PFA1 i PFA2 ependymoma



Rycina 21: Krzywa OS wg Kaplana-Meiera dla podgrup molekularnych PFA1 i PFA2. Poziom istotności Log Rank (Mantel-Cox) wynosi 0,822.

Wniosek: Brak korelacji pomiędzy przynależnością do podgrupy molekularnej PFA1 i PFA2 a przeżywalnością pacjentów.

Wykres przeżycia wolnego od postępu choroby (PFS)
Kaplana-Meiera dla grupy PFA i PFB ependymoma



Rycina 22. Krzywa PFS wg Kaplana-Meiera dla podgrup molekularnych PFA1 i PFA2. Poziom istotności Log Rank (Mantel-Cox) wynosi 0,989.

Wniosek: Brak korelacji pomiędzy przynależnością do podgrupy molekularnej PFA1 i PFA2 a wystąpieniem wznowy procesu nowotworowego.

4.5.2. Charakterystyka kliniczna *medulloblastoma*

Przy pomocy analizy nCounter zidentyfikowano 5 guzów przynależących do grupy transkrypcyjnej WNT, 8 guzów do grupy transkrypcyjnej SHH, 12 guzów do Grupy 3 i 11 guzów do Grupy 4. Charakterystyka kliniczna i histopatologiczna poszczególnych pacjentów przedstawiona jest w Tabeli 25 (str. 77).

Tabela 25. Dane kliniczne pacjentów z rozpoznaniem *medulloblastoma*. Lokalizacja, skróty: Półkula – dotyczy półkul mózdzku, CPA – kąt mostkowo-mózdzkowy. Histopatologia: MBEN – rdzeniak o zwiększonej guzkowatości (*medulloblastoma with extensive nodularity*), NOS MB – rdzeniak NOS (*not otherwise specified medulloblastoma*), LCA – rdzeniak olbrzymiokomórkowy (*large cell anaplastic medulloblastoma*), DM – rdzeniak desmoplastyczny (*desmoplastic medulloblastoma*). PFS - przeżycie wolne od progresji choroby (*progression-free survival*); OS - przeżycie całkowite (*overall survival*); Symbol myślnika oznacza brak danych.

ID	NanoString	Płeć	Wiek	Histopatologia	Lokalizacja	Przerzuty	Wznowa	Zgon	PFS [miesiąc]	OS [miesiąc]
1	MB-WNT	M	11	klasyczny	CPA	tak	nie	nie	193	193
2	MB-WNT	K	12	klasyczny	pośrodkowa	-	nie	nie	108	108
3	MB-WNT	K	12	klasyczny	pośrodkowa	nie	nie	nie	60	60
4	MB-WNT	M	-	-	-	tak	nie	nie	36	36
5	MB-WNT	M	14	klasyczny	pośrodkowa	nie	-	-	-	-
6	MB-SHH	K	11	LCA	półkula	tak	tak	tak	14	19
7	MB-SHH	M	2	LCA	półkula	nie	tak	tak	4	5
8	MB-SHH	M	2	DM	półkula	nie	tak	nie	24	158
9	MB-SHH	K	1	DM	-	nie	tak	nie	25	84
10	MB-SHH	K	1,5	DM	półkula	nie	nie	nie	112	112
11	MB-SHH	K	18	DM	półkula	nie	nie	nie	130	130
12	MB-SHH	M	1	MBEN	półkula	nie	nie	nie	111	111
13	MB-SHH	M	1	DM	półkula	nie	nie	nie	115	115
14	MB-Grupa 3	M	8	NOS MB	pośrodkowa	-	tak	tak	3	5
15	MB-Grupa 3	M	2	klasyczny	-	tak	tak	tak	8	24
16	MB-Grupa 3	M	13	klasyczny	pośrodkowa	tak	tak	tak	19	27
17	MB-Grupa 3	M	11	LCA	pośrodkowa	nie	nie	nie	122	122
18	MB-Grupa 3	M	5	klasyczny	pośrodkowa	nie	nie	nie	69	69
19	MB-Grupa 3	M	6	klasyczny	pośrodkowa	tak	nie	nie	108	108
20	MB-Grupa 3	M	4	klasyczny	pośrodkowa	nie	nie	nie	60	60
21	MB-Grupa 3	M	4	klasyczny	CPA	tak	nie	nie	74	74
22	MB-Grupa 3	M	5	klasyczny	-	nie	nie	nie	60	60
23	MB-Grupa 3	M	5	klasyczny	pośrodkowa	nie	nie	nie	184	184
24	MB-Grupa 3	K	5	klasyczny	pośrodkowa	tak	nie	nie	116	116
25	MB-Grupa 4	M	17	LCA	pośrodkowa	nie	tak	tak	22	23
26	MB-Grupa 4	M	15	NOS MB	pośrodkowa	tak	tak	tak	60	97
27	MB-Grupa 4	M	7	klasyczny	pośrodkowa	-	nie	nie	168	168
28	MB-Grupa 4	M	6	klasyczny	pośrodkowa	tak	nie	nie	120	120
29	MB-Grupa 4	M	9	LCA	pośrodkowa	nie	nie	nie	70	70
30	MB-Grupa 4	K	8	klasyczny	-	tak	nie	nie	60	60
31	MB-Grupa 4	K	6	klasyczny	-	nie	nie	nie	84	84
32	MB-Grupa 4	K	8	LCA	-	nie	nie	nie	60	60
33	MB-Grupa 4	M	9	LCA	pośrodkowa	tak	nie	nie	74	74
34	MB-Grupa 4	K	6	klasyczny	pośrodkowa	nie	-	tak	12	12
35	MB-Grupa 4	K	6	LCA	-	tak	-	tak	-	-

Charakterystyka kliniczna grup molekularnych *medulloblastoma*

Wiek: Średnia wieku w czasie diagnozy dla pacjentów z poszczególnych grup przedstawiona jest w Tabeli 26. Wykonano test jednoczynnikowy ANOVA, który wykazał znamienność na poziomie $p = 0,040$.

Tabela 26. Wiek pacjentów z grup molekularnych *medulloblastoma*.

Grupa molekularna	Średnia wieku	Wariancja
MB-WNT	12,3	4,7
MB-SHH	5,1	2,7
MB-Grupa 3	6,3	1,6
MB-Grupa 4	8,8	1,7
Jednoczynnikowa ANOVA	istotność 0,040 dla MB-WNT vs. pozostałe grupy	

Wniosek: Pacjenci z grupy molekularnej WNT w czasie diagnozy są znamienne starsi od pacjentów z pozostałych grup.

Podtyp histopatologiczny *medulloblastoma*

Oceniono związek pomiędzy podtypem klasycznym, LCA i DM/MBEN a przynależnością do grupy molekularnej. Występowanie podtypu DM związane jest znamienne z przynależnością do grupy transkrypcyjnej SHH (test χ^2 , istotność asymptotyczna wynosi 0,0001).

Lokalizacja guza

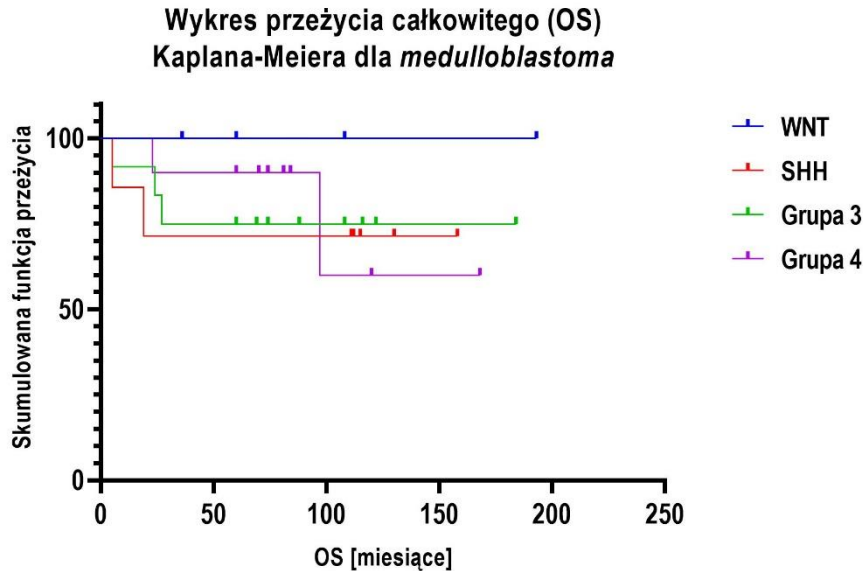
Oceniono związek pomiędzy pośrodkową lub boczną (półkule mózdzku lub CPA) lokalizacją guza, a przynależnością do grupy molekularnej. Występowanie bocznej lokalizacji guza związane jest znamienne z przynależnością do grupy transkrypcyjnej SHH (test χ^2 , istotność asymptotyczna wynosi 0,0001).

Płeć pacjenta, obecność przerzutów

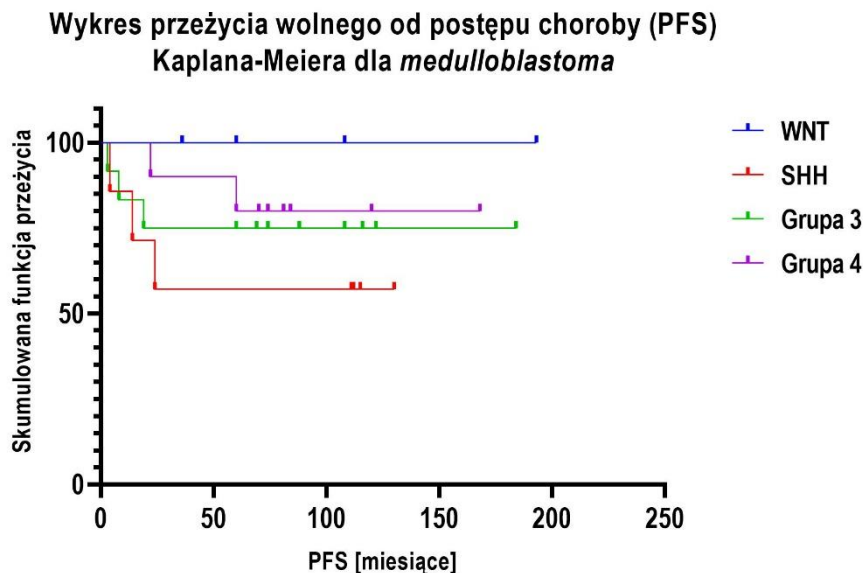
Nie wykazano korelacji pomiędzy przynależnością do grup molekularnych a płcią pacjenta (test χ^2 , istotność asymptotyczna wynosi 0,139), ani obecnością przerzutów (test χ^2 , istotność asymptotyczna wynosi 0,303) w analizowanej serii pacjentów.

Analiza przeżycia wg Kaplana-Meiera

Wykonano analizę przeżycia OS i PFS dla pacjentów z grup transkrypcyjnej WNT, SHH oraz Grupy 3 i Grupy 4 (Rycina 23, Rycina 24).



Rycina 23. Krzywa OS wg Kaplana-Meiera dla grup transkrypcyjnych WNT, SHH, Grupy 3 i Grupy 4 medulloblastoma. Poziom istotności Log Rank (Mantel-Cox) wynosi 0,745.



Rycina 24. Krzywa PFS wg Kaplana-Meiera dla grup transkrypcyjnych WNT, SHH, Grupy 3 i Grupy 4 medulloblastoma. Poziom istotności Log Rank (Mantel-Cox) wynosi 0,442.

Wniosek: Analizy statystyczne nie wykazały różnicy pomiędzy przynależnością do grupy molekularnej i przeżyciem pacjenta. Niemniej wszyscy czterej pacjenci z grupy transkrypcyjnej WNT żyją od 36 do 193 miesięcy od rozpoznania bez objawów nawrotu choroby.

4.5.3. Charakterystyka kliniczna CNS HGNET-BCOR

Analiza nCounter 91 podnamiotowych guzów mózgu ujawniła dwa nowotwory z pozytywną sygnaturą genów markerowych dla CNS HGNET-BCOR. Tabela 27 przedstawia dane kliniczne tych dwóch pacjentów.

Tabela 27. Dane kliniczne pacjentów z grupy molekularnej CNS HGNET-BCOR.

Grupa molekularna/ID	Płeć	Wiek	Diagnoza oryginalna	Lokalizacja	Przerzuty	Wznowa	Zgon	PFS [miesiąc]	OS [miesiąc]
CNS HGNET-BCOR/BCOR-G	M	9	glejak	most mózgu	nie	tak	tak	29	31
CNS HGNET-BCOR/BCOR-M	K	2,5	rdzeniak	półkula mózdzku	nie	nie	nie	66	66

Wykazano odmienną charakterystykę kliniczną pacjentów należących do grupy nowotworów CNS HGNET-BCOR. Oryginalne diagnozy były różne, w przypadku nowotworu BCOR-G pierwotnie rozpoznano glejaka, a w przypadku BCOR-M - *medulloblastoma*. Obydwa przypadki sklasyfikowane jako CNS HGNET-BCOR posiadały także odmienne lokalizacje. Guz BCOR-G zlokalizowany był w moście mózgu, natomiast BCOR-M zlokalizowany był w półkuli mózdzku. Obydwa przypadki różnią się również wiekiem w czasie diagnozy (2,5 lat w przypadku BCOR-G i 9 lat w przypadku BCOR-M), płcią pacjenta i, co istotne, w przypadku BCOR-G wystąpieniem wznowy choroby ok. 2,5 roku od postawienia rozpoznania.

5. Dyskusja

W większości szpitali i laboratoriów patomorfologicznych tkanki nowotworów przechowywane są w formie bloczków parafinowych, stanowiąc tym samym zasoby do wykorzystania i poszerzenia wiedzy o ich biologii [71, 73]. Zgromadzona ogromna ilość materiału archiwalnego FFPE wykorzystywana jest przede wszystkim do badań histopatologicznych i immunohistochemicznych. Wynika to z faktu, że w trakcie utrwalania materiału za pomocą formaliny i parafiny, tkanki poddawane są procedurom fizykochemicznym, które wpływają negatywnie na integralność kwasów nukleinowych [85]. Poza tym, materiał starzejąc się ulega dodatkowym zmianom, które potęgują niekorzystny wpływ na struktury zatopione w bloczku parafinowym. Procedura utrwalania, odwadniania i zatapiania materiału w bloczki parafinowe może różnić się w poszczególnych ośrodkach, co powoduje, że trudno jest o ujednoczenie badań prowadzonych w oparciu o taki materiał [71, 86, 87]. Było to powodem eliminowania próbek FFPE z użycia w niektórych technikach biologii molekularnej, takich jak qRT-PCR, mikromacierze, czy sekwencjonowanie nowej generacji. Dla uzyskania wiarygodnych wyników metody te wymagają pracy z RNA posiadającym wysoki stopień integralności, definiowany jako współczynnik RIN oraz wysoką czystość, trudną do osiągnięcia w przypadku próbek FFPE. Dlatego, biorąc pod uwagę powyższe uwarunkowania, wskazane jest zabezpieczanie materiału mrożonego w celu utrzymania wysokiej jakości RNA z badanych tkankach, co stwarza dodatkowe problemy organizacyjne i finansowe dla przeprowadzenia rutynowej diagnostyki.

W przeprowadzonych obecnie badaniach podjęto próbę wykorzystania materiału FFPE w oparciu o analizę nCounter technologii NanoString w celu klasyfikacji molekularnej podnamiotowych nowotworów OUN u dzieci i zaproponowania wprowadzenia tego typu diagnostyki do rutynowej pracy laboratoriów szpitalnych. Technologia NanoString opiera się na zasadzie hybrydyzacji komplementarnej cząsteczki sondy molekularnej do analizowanej cząsteczki RNA, podobnie jak w przypadku mikromacierzy, nie wymaga jednak konieczności przepisywania RNA na cDNA, ani amplifikacji kwasu nukleinowego. Sprawia to, że zdegradowany RNA pochodzący z materiału tkankowego FFPE nadaje się do przeprowadzenia analizy profilowania poziomu ekspresji genów. Równocześnie można analizować 12 próbek, a wstępne przygotowanie do analizy obejmuje wyłącznie izolację RNA i jego rozcieńczenie. Praca z uzyskanym RNA oraz późniejsza hybrydyzacja tego materiału z sondami pozwala na uzyskanie wyniku szybciej niż w przypadku standardowych technik biologii molekularnej.

I tak, w przypadku użycia systemu analiz nCounter wynik analizy ekspresji genów otrzymujemy w dwa dni, co stanowi dużą zaletę, zwłaszcza w przypadkach guzów o dużej inwazyjności, wymagających natychmiastowego wdrożenia terapii. Porównując to do sekwencjonowania, np. przy użyciu platformy Illumina MiSeq RNAseq, omijamy etap odwrotnej transkrypcji, fragmentacji materiału, a także konstrukcji biblioteki. Wyniki analizy nCounter są prostsze do interpretacji niż te uzyskane przy sekwencjonowaniu, gdzie wymagana jest znajomość zaawansowanych metod bioinformatycznych [88].

Niewątpliwie największym ograniczeniem stosowania technologii NanoString jest wyjątkowo droga aparatura. Poza tym, aktualnie produkowane kartridże NanoString ograniczają analizowanie próbek do 12. Mając na uwadze ich potencjalne wykorzystanie do diagnozowania guzów dziecięcych, np. *medulloblastoma* grupy transkrypcyjnej WNT, jedno miejsce na kartridżu powinno zostać zużyte na próbę referencyjną. Załączenie próbek referencyjnych dla innych rzadkich grup molekularnych jest także konieczne, aby uzyskać jednoznacznie porównywalny profil dla analizowanego guza.

Pomimo swoich ograniczeń technologia NanoString staje się metodą coraz częściej stosowaną do badania ekspresji genów właśnie dzięki możliwości stosowania materiału FFPE. Ten rodzaj analizy znalazł już zastosowanie w onkologii, immunologii, weterynarii, naukach rolniczych, jak również neurobiologii, czy medycynie regeneracyjnej. Większość prac opublikowanych do 2021 roku skupia się na wykorzystaniu paneli onkologicznych, takich jak PanCancer IO360, czy Tumor Signaling 360, możliwych do użycia na próbkach guzów ludzkich i mysich. Panele onkologiczne NanoString są używane również w przypadku badań klinicznych, w tym do profilowania immunogenetycznego potrójnie negatywnego raka piersi [89]. Wykazano, że profilowanie molekularne wykonane za pomocą panelu PanCancer IO360 pomaga w ustaleniu, które pacjentki mają największe prawdopodobieństwo wznowy choroby nowotworowej i śmierci po otrzymaniu terapii neoadjuwantowej. Natomiast panel PanCancer Pathways wykorzystano do profilowania ekspresji 770 genów zaangażowanych w 13 ścieżek sygnałowych w badaniu klinicznym dotyczącym raka trzustki [90].

W roku 2012 opublikowano pierwszą pracę, wykorzystującą analizę nCounter technologii NanoString jako metodę uzupełniającą proces diagnostyczny w onkologii dziecięcej [84]. Badania dotyczyły identyfikacji czterech odrębnych grup molekularnych *medulloblastoma*. Wykazano, że analiza nCounter może stać się szybszym i bardziej ekonomicznym narzędziem diagnostycznym w porównaniu ze skomplikowaną techniką mikromacierzy i łącznie z oceną histopatologiczną pozwala na postawienie precyzyjnej, zintegrowanej diagnozy.

W neuroonkologii dziecięcej istnieje wyraźna konieczność stosowania molekularnej klasyfikacji nowotworów OUN, która pomoże usprawnić stratyfikację pacjentów do grup ryzyka, planowanie badań klinicznych oraz projektowanie kolejnych badań naukowych, mających na celu charakterystykę biologiczną poszczególnych grup molekularnych. Większość przypadków nowotworów OUN wieku dziecięcego posiada specyficzne mutacje, różne profile metylacji DNA i wykazuje znaczną heterogenność molekularną, która w wielu przypadkach nie koreluje z podtypem histologicznym guza.

Ocena morfologiczna pozostaje techniką subiektywną i może sprawiać duże problemy w diagnostyce różnicowej ze względu na podobieństwo obrazu histopatologicznego różnych typów nowotworów. Przynależność do podtypu histologicznego nowotworu nie definiuje grupy molekularnej i odwrotnie. I tak, w przypadku czterech grup molekularnych *medulloblastoma*, podtyp klasyczny może występować zarówno w dobrze rokującej grupie transkrypcyjnej WNT, jak i w źle rokującej Grupie 3, czy Grupie 4. Natomiast podtyp LCA, powiązany z gorszym przeżyciem pacjentów, obserwowany jest niekiedy w przypadkach grupy transkrypcyjnej WNT i grupy SHH. W związku z tym, w dwóch ostatnich klasyfikacjach WHO nowotworów OUN z 2016 i 2021 roku podkreślono, że rozpoznanie *medulloblastoma* wyłącznie na podstawie obrazu histologicznego jest niewystarczające i powinno być uzupełnione o ocenę podłoża molekularnego.

Jako kolejny przykład może posłużyć *ependymoma*, gdzie do tej pory nie ustalono jednolitych kryteriów definiowania 2 i 3 stopnia złośliwości histopatologicznej według WHO. W 2011 roku podjęto próbę opracowania ulepszonego schematu oceny morfologicznej tego nowotworu [70]. Badania obejmowały trzyetapową analizę histopatologiczną 229 przypadków *ependymoma* przez pięciu doświadczonych neuropatologów. Ujednolicenie procedury okazało się trudne do osiągnięcia ze względu na podobieństwo morfologiczne w obu stopniach złośliwości, jak również subiektywną ocenę anaplazji. Obecnie uważa się, że określenie drugiego lub trzeciego stopnia złośliwości histopatologicznej nie posiada istotnego znaczenia klinicznego, wobec czego niezbędne jest uzupełnienie oceny patomorfologicznej o badanie molekularne.

Wieloośrodkowa praca badawcza z 2016 roku, obejmująca analizę profili metylacji DNA w 323 przypadkach PNET i 211 guzów referencyjnych, była kamieniem milowym, wyznaczającym nowe zasady diagnostyczne nowotworów OUN. Wyodrębnienie czterech nowych typów nowotworów z puli guzów typu PNET utwierdziło badaczy w przekonaniu, że zastosowanie technik biologii molekularnej jest jedynym sposobem, niezbędnym do opracowania nowych zasad klasyfikacji guzów OUN. Udowodniono wtedy, że większość

PNET-ów można zaklasyfikować do istniejących już rodzajów nowotworów, a wykryte cztery nowe typy nowotworów posiadają unikalne zmiany genetyczne i odmienną charakterystykę kliniczną. Wyniki tej pracy stały się powodem usunięcia kategorii PNET z czwartej aktualizacji klasyfikacji WHO guzów OUN. Biorąc pod uwagę rzadkie występowanie nowych typów nowotworów, omawiane badania stanowiły najbardziej pokaźne źródło wiedzy o tych guzach do 2019 roku. Według wstępnych danych, pacjenci z nowotworami CNS HGNET-MN1 i CNS NB-FOXR2 posiadają dobre rokowanie, w przeciwieństwie do pacjentów z diagnozą CNS HGNET-BCOR. Chociaż te nowe kategorie nowotworów nie zostały dotychczas ujęte w klasyfikacji WHO 2016, przewidywane było wpisanie ich do następnego wydania klasyfikacji ze względu na duże znaczenie kliniczne [91, 92]. W trakcie pisania tej pracy ukazała się nowa klasyfikacja WHO CNS2021 [1], w której niektóre z omawianych guzów zostały już uwzględnione.

Dzięki analizie profilu metylacji DNA, czy zastosowaniu sekwencjonowania, możliwe jest wytypowanie grup molekularnych, w tym czterech opisanych wcześniej nowych nowotworów OUN [82]. Metody te, mimo swojej dokładności, pozostają trudne do wprowadzenia do rutynowej praktyki szpitalnej. Poszukiwania markerów molekularnych dla tych czterech typów guzów zaowocowało opublikowaną przez nas w 2020 pracą [60], która potwierdziła możliwość użycia analizy nCounter do rozróżniania CNS HGNET-BCOR, CNS HGNET-MN1, CNS NB-FOXR2 oraz CNS EFT-CIC za pomocą unikalnej sygnatury genowej. Badania przeprowadzono na 187 guzach pediatrycznych o wysokim stopniu złośliwości, które oprócz analizy ekspresji genów obejmowały również charakterystykę kliniczną pacjentów i ocenę histopatologiczną preparatów. Należy zaznaczyć, że w opublikowanej pracy znajdowały się także guzy analizowane w niniejszej pracy doktorskiej. Wśród puli analizowanych guzów znaleziono 14 guzów o sygnaturach CNS HGNET-BCOR, CNS HGNET-MN1, CNS NB-FOXR2 i CNS EFT-CIC, co stanowiło 7,4% wszystkich analizowanych próbek (w porównaniu do 23,8% udokumentowanych przez Sturm i wsp. gdzie analizowano tylko guzy z rozpoznaniem PNET) [56]). Większość przebadanych nowotworów posiadało lokalizację nadnamiotową. Rzadka wykrywalność tych guzów, jak również częste ich błędne zaklasyfikowanie, dodatkowo wskazuje na konieczność wdrożenia ujednoliconej diagnostyki molekularnej.

W niektórych kategoriach guzów mózgu o lokalizacji podnamiotowej nie zidentyfikowano specyficznych mutacji, czy aberracji chromosomalnych, które mogłyby posłużyć jako molekularne markery diagnostyczne. W takich przypadkach profilowanie ekspresji genów lub

metylacji DNA pozostaje jedyną możliwością oceny podłoża molekularnego procesu nowotworowego. Oczywiście nie zawsze badania molekularne są jednoznaczne. I tak na przykład duplikacja chromosomu 1q pomimo, że jest często wykrywana w *ependymoma* PFA i jej wystąpienie koreluje z gorszym przeżyciem, nie występuje w każdym przypadku wyściółczaka PFA. Dlatego nie można zakwalifikować pacjenta do grupy ryzyka PFA wyłącznie za pomocą tego markera genetycznego. Brak duplikacji chromosomu 1q nie oznacza również, że pacjenta można zakwalifikować do grupy o niskim ryzyku. Duplikacja ta ponadto jest nieswoista i obserwuje się ją również w innych typach guzów np. CNS NB-FOXR2 [92].

Podobny problem występuje w przypadku Grupy 3 i Grupy 4 *medulloblastoma*, które charakteryzują się złą prognozą kliniczną, w porównaniu do przypadków *medulloblastoma* grup transkrypcyjnych WNT i SHH. Jednak pacjenci z Grupy 3 mają gorsze rokowanie niż pacjenci z Grupy 4. Nie odnaleziono dotychczas jednego, charakterystycznego markera genetycznego, za pomocą którego można by było odróżnić te grupy molekularne. Co więcej, obie te grupy charakteryzują się występowaniem izochromosomu 17q. W przypadku Grupy 3 *medulloblastoma* wystąpienie izochromosomu 17q wraz z równoczesną amplifikacją *MYC* wiąże się z 20% szansą na przeżycie w ciągu pięciu lat od postawienia diagnozy. Odwrotnie jest w Grupie 4, gdzie izochromosom 17q nie stanowi złego czynnika prognostycznego [51]. Ponadto, nie dziwi również obserwacja wysokiej heterogenności Grup 3 i 4 oraz występowanie przejściowej Grupy 3/4 [50]. Dlatego w *medulloblastoma*, podobnie jak w podnamiotowych *ependymoma*, profilowanie wielogenowe pozostaje jedynym podejściem w identyfikacji istotnych klinicznie grup molekularnych.

Mając na uwadze powyżej przedstawione aspekty, w przedstawionej pracy doktorskiej podjęto badania w oparciu o profilowanie ekspresji genów, które mogą stanowić podstawę do ustalenia klasyfikacji pediatrycznych guzów podnamiotowych OUN.

Analizę ekspresji genów rozpoczęto od procesu normalizacji wyników i znormalizowane dane zostały poddane ocenie jakościowej (QC), która niezbędna jest do oceny przydatności próbek RNA w celu dalszej analizy ekspresji genów. W wyniku kontroli jakości z puli 113 analizowanych próbek usunięto 4 próbki oflagowane w programie jako niskiej jakości (komunikat „*QC flag*”). Powtórzenie doświadczenia (zarówno izolacji, jak i analizy metodą nCounter) nie wpłynęło na zmianę komunikatu. Jakość próbek nie poprawiła się i wynikało to najprawdopodobniej z faktu, że te tkanki nowotworowe posiadały obszary martwicy oraz

wylewy krwi. Na jakość tych próbek RNA mógł też wpłynąć któryś z etapów utrwalenia tkanki w bloczku parafinowym, bądź długość okresu przechowywania bloczka parafinowego.

W wyniku wstępnych analiz z 5 genów referencyjnych usunięto dwa geny *LDHA* i *TUBB*, wykazujące się najwyższym odchyleniem standardowym poziomu ekspresji. Pozostałe sondy molekularne spełniały założenia eksperymentu, wykazując wysoką ekspresję dla wszystkich analizowanych próbek w poszczególnych nowotworach: *ependymoma*, *medulloblastoma*, pHGG, CNS HGNET-MN1 i CNS HGNET-BCOR.

W wyniku analiz ekspresji genów, w 49 przypadków podnamiotowych wyściółczaków wyróżniono dwie grupy i dwie podgrupy molekularne.

W pierwszej hierarchicznej analizie skupień zidentyfikowano dwie grupy molekularne PFA i PFB za pomocą 10 genów sygnaturowych. W trakcie tej analizy jeden guz nie zaklasyfikował się do grupy PFA ani PFB. Grupa 7 guzów PFB rozróżniona została za przy użyciu pięciu genów markerowych: *C9orf72*, *CEP83*, *DNAH1*, *NELL2* i *NXNL2*. Z analizy statystycznej wynikało, że zgodnie z przewidywaniami opartymi o dane literaturowe, przynależność do grupy molekularnej PFB wiąże się z dobrym przeżyciem. W grupie PFB odnotowano jeden zgon pacjenta, niezwiązany z chorobą nowotworową, co spowodowało usunięcie tej próbki z dalszych analiz. Wszyscy pozostali pacjenci z grupy PFB żyją, a średnia wieku w dniu ustalenia diagnozy wynosiła 8,3 roku i jest znamienne wyższa od pacjentów grupy PFA.

Guzy z liczniejszej grupy PFA, liczącej 41 przypadków, również zidentyfikowano za pomocą pięciu genów markerowych, *ALDH1L1*, *CXorf67*, *IGSF1*, *LAMA2* i *SLC6A13*. Jak wspomniano wyżej, grupa ta, w przeciwieństwie do grupy PFB, wyróżnia się znamienne niższym wiekiem w chwili rozpoznania (3,6 lat) oraz znamienne gorszym wskaźnikiem przeżycia, z medianą dla OS wynoszącą 78 miesięcy i medianą dla PFS wynoszącą 44 miesięcy. Nie znaleziono korelacji pomiędzy przynależnością do grupy molekularnej a płcią pacjenta, obecnością przerzutów czy stopniem złośliwości histopatologicznej wg WHO.

Wartym podkreślenia jest fakt, że *ependymoma* o 2 i 3 stopniu złośliwości histopatologicznej zidentyfikowano zarówno w grupie molekularnej PFA i PFB. Potwierdza to, że podejmowanie decyzji terapeutycznych wyłącznie w oparciu o analizę histopatologiczną jest niewłaściwe i klasyfikacja molekularna jest niezbędna do oceny rokowania pacjenta.

Guzy z grupy PFA odznaczały się znaczną heterogennością molekularną, co potwierdzają opublikowane doniesienia o istnieniu dwóch podgrup molekularnych, PFA1 i PFA2,

i ich ewentualnych dodatkowych wariantach [83]. Dodatkowe zróżnicowanie grupy PFA powiodło się przy użyciu markerów *SKAP2*, *WIF1*, *EN2* i *CNPY1*. Pacjenci z grup PFA1 i PFA2 byli zdiagnozowani w podobnym wieku, ze średnią 3,6 roku w przypadku PFA1 i średnią 2,8 roku w przypadku PFA2, wobec czego nie wykazano istotności statystycznej uzyskanych danych, jak również korelacji pomiędzy przynależnością do podgrupy molekularnej a przerzutami i stopniem złośliwości nowotworu. Także analizy przeżycia wg Kaplana-Meiera nie wykazały istotnej statystycznie różnicy zarówno dla przeżycia OS, jak i PFS, co potwierdza uzyskane uprzednio wyniki [83]. Jednakże w przeciwieństwie do opublikowanych dotąd danych, do podgrupy molekularnej PFA2 zakwalifikowano w niniejszej pracy wyłącznie chłopców, co wskazało na istotną statystycznie przewagę płci męskiej. Niemniej wyniki te wymagają dalszego potwierdzenia, gdyż zidentyfikowana podgrupa jest nieliczna (8 przypadków).

W podsumowaniu można stwierdzić, że metoda profilowania transkrypcyjnego z zastosowaniem techniki NanoString rozróżnia grupy i podgrupy molekularne *ependymoma*. Wyniki uzyskane w badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy potwierdzają wcześniejsze dane literaturowe, wskazujące, że identyfikacja grupy molekularnej *ependymoma* ma znaczenie kliniczne i można dzięki niej stratyfikować pacjentów do grup ryzyka.

Stosując analizę nCounter udało się również wyróżnić dwie podgrupy molekularne PFA, jednak nie wykazano ich przydatności klinicznej. Zgadza się to z danymi literaturowymi, w których również nie wykazano korelacji między przynależnością do podgrupy PFA1 i PFA2 a wiekiem pacjenta, stopniem agresywności nowotworu, czy przeżyciem pacjentów.

Hierarchiczna analiza skupień 41 próbek *medulloblastoma* za pomocą 29 genów umożliwiła rozróżnienie czterech głównych grup molekularnych, zgodnie z doniesieniami innych grup badawczych [22]. Najliczniejszymi grupami guzów w analizowanym zbiorze próbek okazały się Grupa 3 i Grupa 4, co także zgadza się z doniesieniami literaturowymi na temat *medulloblastoma*.

Jednym z użytych w naszej analizie markerów molekularnych dla grupy transkrypcyjnej WNT był gen *ALK*. W oparciu o doniesienia literaturowe, jak również wysoki poziom ekspresji RNA, wykazany w trakcie analizy nCounter, wykonano barwienia immunohistochemiczne w celu wykrycia ekspresji genu na poziomie białka w preparatach histopatologicznych *medulloblastoma* z grupy transkrypcyjnej WNT. Jako kontrolę użyto raka splotu naczyniówkowego, który ma również lokalizację podnamiotową. Ekspresję białka ALK

wykazano jedynie w preparatach *medulloblastoma* WNT-*activated*, co sugeruje, że immunoekspresja białka ALK może być surogatem diagnostycznym dla tej grupy molekularnej *medulloblastoma*, stwarzając możliwość szybszej stratyfikacji tych pacjentów do grupy niskiego ryzyka.

W trakcie analizy próbek *medulloblastoma* wyodrębniono sześć guzów, które nie zaklasyfikowały się do żadnej grupy molekularnej. By upewnić się o przynależności tych próbek do grupy molekularnej *medulloblastoma* użyto trzech sond markerowych, specyficznych dla całej grupy *medulloblastoma*, *SSTR2*, *NEUROD1* i *ACTL6B*. Wykazano, że trzy niesklasyfikowane guzy nie wykazały ekspresji badanych genów markerowych. Zasugerowało to, że guzy te mogą reprezentować inne rodzaje nowotworów.

W wyniku analiz statystycznych danych klinicznych pacjentów z rdzeniakami nie udało się ustalić korelacji między przynależnością do grupy molekularnej, a płcią pacjentów, ani obecnością przerzutów.

Grupa WNT *medulloblastoma* reprezentuje pacjentów zmiennie starszych od pozostałych grup molekularnych, ze średnią wieku w momencie rozpoznania wynoszącą 12,3 lat. Mimo, że analizy krzywych przeżycia OS i PFS nie wykazały różnic pomiędzy grupami molekularnymi ze względu na małą liczbę analizowanych przypadków, grupa transkrypcyjna WNT wyróżnia się brakiem zgonów pacjentów i wysoką przeżywalnością, sięgającą do 193 miesięcy od rozpoznania. Potwierdza to uprzednio opublikowane wyniki analiz klinicznych i wskazuje, że w przypadku grupy transkrypcyjnej WNT istnieje potrzeba redukcji dawki naświetlania [93].

Pacjenci z grupy transkrypcyjnej SHH mają średnio 5 lat w czasie postawienia diagnozy i jest to najmłodsza grupa wiekowa analizowanych pacjentów z *medulloblastoma*. W trakcie analiz ustalono, że istnieje korelacja pomiędzy przynależnością do grupy SHH i lokalizacją guza w tej grupie, a także podtypem histopatologicznym. Dodatkowo, wykazano, że najczęstszym podtypem histopatologicznym występującym w tej grupie jest podtyp desmoplastyczny. Potwierdza to dane literaturowe i wskazuje, że identyfikacja grupy transkrypcyjnej SHH przy użyciu metody opartej na technologii NanoString w analizowanej serii pacjentów jest wiarygodna i diagnostycznie użyteczna.

Najnowsze doniesienia, dotyczące grupy SHH *medulloblastoma* sugerują, że jest ona heterogenna i posiada dwie główne podgrupy molekularne – SHH-1 i SHH-2 [94]. Główną różnicą między tymi podgrupami jest współczynnik 5-letniego przeżycia wolnego od progresji, który wyższy jest w przypadku podgrupy SHH-2 i wynosi 75,4%, w przeciwieństwie do 27,8%

dla podgrupy SHH-1. Ten fakt ma wpływ na ewentualną zmianę terapii pacjentów zakwalifikowanych do podgrupy SHH-2, w tym redukcji dawek radioterapii, podobnie jak w przypadku grupy WNT *medulloblastoma*. Grupa transkrypcyjna SHH dzielona jest również ze względu na obecność mutacji w genie *TP53*. Mimo, że mutacja ta występuje tylko u 20% pacjentów *medulloblastoma SHH-activated*, należy pamiętać, że wykrycie jej wiąże się z wyższym ryzykiem dla pacjenta i niższą szansą na wyleczenie [33]. Fakty te sprawiają, że przyszłe badania naukowe i projektowanie badań klinicznych musi uwzględniać występowanie dodatkowych zmian molekularnych w grupie transkrypcyjnej SHH. Wyniki niniejszej pracy, oparte na profilowaniu ekspresji genów markerowych przy pomocy technologii NanoString, dotyczą identyfikacji całej grupy SHH, bez uwzględniania jej heterogenności. Należy zatem kontynuować poszukiwania specyficznych dla podgrup SHH sygnatur genowych w celu precyzyjnej stratyfikacji pacjentów pediatrycznych do grup ryzyka.

W podsumowaniu można stwierdzić, że metoda profilowania transkrypcyjnego z zastosowaniem techniki NanoString przedstawiona w tej pracy rozróżnia podstawowe grupy molekularne *medulloblastoma*, w tym pomaga w odróżnieniu Grupy 3 od Grupy 4, które posiadają wiele wspólnych cech histologicznych i klinicznych. Szybka diagnostyka molekularna, którą można osiągnąć dzięki tej technice, może pomóc w usprawnieniu stratyfikacji pacjentów, co wydaje się być istotne zwłaszcza w przypadku rdzeniaka grupy transkrypcyjnej WNT.

Jak wcześniej wspomniano, w trakcie hierarchicznej analizy skupień z puli próbek *medulloblastoma* usunięto trzy próbki, które nie posiadały wysokiej ekspresji genów markerowych dla tego typu nowotworu. Było to podstawą do przeprowadzenia kolejnych analiz, które uwzględniały inne niż *medulloblastoma* guzy podnamiotowe – referencyjne guzy CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1, wyściółczaki, glejaka i guzy rzadziej występujące takie jak AT/RT, CPC. Zastosowano w nich geny markerowe dla guzów CNS HGNET-BCOR i CNS HGNET-MN1, dzięki czemu udało się zidentyfikować dwa guzy należące do grupy CNS HGNET-BCOR, które wcześniej były rozpoznane jako *medulloblastoma* (BCOR-M) oraz glejak (BCOR-G). Dodatkowe analizy z sondami markerowymi i próbkami referencyjnymi dla rdzeniaka i glejaka ostatecznie wykluczyły postawione wcześniej diagnozy.

W celu sprawdzenia, czy wysoka ekspresja genu *BCOR* na poziomie RNA przekłada się na wysoką ekspresję białka BCOR, wykonano barwienia immunohistochemiczne w tych dwóch guzach podnamiotowych. W obu badanych przypadkach, BCOR-M i BCOR-G, potwierdzono obecność ekspresji białka BCOR, co potwierdza przydatność tego biomarkera

immunohistochemicznego w diagnostyce guzów CNS HGNET-BCOR. Ze względu na ograniczoną ilość próbek wskazane jest udokumentowanie tego wyniku na większej ilości guzów CNS HGNET-BCOR.

Należy dodać, że w związku z odmiennym rozpoznaniem pierwotnym, różniło się również podejście terapeutyczne u tych pacjentów. Pacjent BCOR-G leczony był według drugiej wersji protokołu dla glejaków o wysokim stopniu złośliwości, natomiast pacjent BCOR-M według protokołu ryzyka standardowego dla *medulloblastoma*. Dane kliniczne tych dwóch pacjentów z grupy CNS HGNET-BCOR wykazały różnice w charakterystyce klinicznej i przebiegu choroby. Pacjent BCOR-M żyje 66 miesięcy bez nawrotu, co może wnieść wkład do dyskusji na temat złego rokowania w tej grupie. Wszystko to wskazuje na prawdopodobieństwo wysokiej heterogenności guzów z grupy molekularnej CNS HGNET-BCOR. Nie istnieją aktualnie protokoły lecznicze dla grupy guzów CNS HGNET, jednakże podjęto pierwsze próby użycia inhibitorów szlaku sygnałowego SHH w liniach komórkowych utworzonych z guzów od pacjentów CNS HGNET-BCOR [95].

W oryginalnej pracy, opisującej cztery nowe grupy nowotworów, wśród 323 próbek odnaleziono wyłącznie 11 przypadków CNS HGNET-MN1, z czego większość zlokalizowana była nadnamiotowo [56]. Wśród 113 analizowanych próbek w niniejszej pracy nie odnaleziono żadnego guza CNS HGNET-MN1, oprócz guza referencyjnego, co potwierdza jego bardzo rzadkie występowanie w podnamiotowej lokalizacji OUN.

Jak wspomniano, zarówno CNS HGNET-BCOR, jak i CNS HGNET-MN1, były poprzednio rozpoznawane jako PNET, gdyż nie wykazują morfologicznych cech specyficznych dla swojej kategorii. Rzadkie występowanie tych guzów oraz ich błędne oryginalne zaklasyfikowanie, zostało potwierdzone w niniejszej pracy. Wszystko to potwierdza, że zastosowanie metod diagnostyki molekularnej, w tym analizy nCounter technologii NanoString, jest jedynym słusznym podejściem w rozpoznaniu tych guzów.

6. Podsumowanie

Przeprowadzone badania molekularne potwierdziły użyteczność metody NanoString, opartej na profilu transkrypcyjnym szeregu genów markerowych, w diagnostyce grup molekularnych nowotworów wieku dziecięcego i jej użyteczność w pogłębianiu wiedzy na temat ich biologii. Zaproponowana nowa metoda diagnostyczna umożliwia analizę zdegradowanego RNA, jest zatem kompatybilna z próbkami guzów utrwalonymi w formalinie i zatopionymi w parafinie (FFPE).

Wybrane sygnatury genowe sprawdzają się w diagnostyce molekularnej *medulloblastoma*, *ependymoma*, jak również CNS HGNET-BCOR. Ustalono, że przynależność do grupy PFB *ependymoma* jest dobrym markerem prognostycznym.

Ze względu na rzadkość występowania nowotworów wieku dziecięcego OUN, zwłaszcza takich guzów jak CNS HGNET-BCOR, czy CNS HGNET-MN1, dalsze prace badawcze powinny być podjęte we współpracy z innymi ośrodkami naukowych, zajmującymi się badaniami w zakresie neuroonkologii dziecięcej.

7. Wnioski

1. Metoda diagnostyczna oparta na profilowaniu transkrypcyjnym szeregu genów sygnaturowych z bloczków parafinowych (FFPE) przy użyciu NanoString nCounter jest użytecznym narzędziem do identyfikacji i różnicowania grup i podgrup molekularnych podnamiotowych guzów mózgu o wysokim stopniu złośliwości u dzieci, w tym:
 - a. grup molekularnych PFA i PFB oraz podgrup PFA1 i PFA2 *ependymoma*,
 - b. grup molekularnych WNT, SHH, Grupy 3 i Grupy 4 *medulloblastoma*,
 - c. sygnatury genetycznej guzów mózgu o wysokim stopniu złośliwości: CNS HGNET-MN1 i CNS HGNET-BCOR.
2. Metoda NanoString jest wiarygodna i pozwala na zastosowanie ograniczonej liczby sond, wykrywających geny markerowe o wysokiej ekspresji. Opiera się na systemie otwartym, a dodatkowe sondy można dodać do niestandardowego zestawu.
3. Diagnostyka molekularna oparta o metodę NanoString pozwala na wykrycie dalszej heterogenności w obrębie wcześniej zidentyfikowanych grup molekularnych.
4. Przynależność do grupy molekularnej PFA bądź PFB w przypadku *ependymoma* koreluje z parametrem klinicznym, jakim jest przeżycie pacjentów.
5. Przynależność do grupy molekularnej w przypadku *medulloblastoma* koreluje z parametrem klinicznym, jakim jest wiek diagnozy pacjenta. Dodatkowo, ustalono, że przynależność do grupy transkrypcyjnej SHH koreluje z występowaniem podtypu histologicznego rdzeniaka desmoplastycznego, jak również występowaniem bocznej lokalizacji guza.
6. Identyfikacja markerów prognostycznych, w uzupełnieniu do stosowanych badań patomorfologicznych i klinicznych, może stanowić podstawę do wprowadzenia spersonalizowanych protokołów terapeutycznych.
7. Badania immunohistochemiczne w przypadku *medulloblastoma* i CNS HGNET-BCOR wykazały, że wysoka ekspresja genów *ALK* i *BCOR* koresponduje z ekspresją białek i tym samym potwierdziły swoją potencjalną użyteczność diagnostyczną. Grupę transkrypcyjną WNT *medulloblastoma* można zidentyfikować za pomocą przeciwciała anti-ALK, natomiast immunoekspresja białka BCOR jest obecna w guzach CNS HGNET-BCOR.

8. Bibliografia

1. Louis, D.N., et al., *The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Neuro-Oncology, 2021. **23**(8): p. 1231-1251.
2. De, B., et al., *Patterns of relapse for children with localized intracranial ependymoma*. Journal of Neuro-Oncology, 2018. **138**(2): p. 435-445.
3. Hubner, J.M., et al., *Epidemiology, molecular classification and WHO grading of ependymoma*. J Neurosurg Sci, 2018. **62**(1): p. 46-50.
4. Merchant, T.E., et al., *Conformal Radiation Therapy for Pediatric Ependymoma, Chemotherapy for Incompletely Resected Ependymoma, and Observation for Completely Resected, Supratentorial Ependymoma*. Journal of Clinical Oncology, 2019. **37**(12): p. 974-983.
5. Jakacki, R.I., et al., *Single-agent erlotinib versus oral etoposide in patients with recurrent or refractory pediatric ependymoma: a randomized open-label study*. Journal of Neuro-Oncology, 2016. **129**(1): p. 131-138.
6. Dewire, M., et al., *An open-label, two-stage, phase II study of bevacizumab and lapatinib in children with recurrent or refractory ependymoma: a collaborative ependymoma research network study (CERN)*. Journal of Neuro-Oncology, 2015. **123**(1): p. 85-91.
7. Kieran, M.W., et al., *Phase I study of gene-mediated cytotoxic immunotherapy with AdV-tk as adjuvant to surgery and radiation for pediatric malignant glioma and recurrent ependymoma*. Neuro-Oncology, 2019. **21**(4): p. 537-546.
8. Huang, B., et al., *Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human ependymomas*. Acta Neuropathologica, 2002. **103**(4): p. 415-420.
9. Nijssen, P.C., et al., *Familial anaplastic ependymoma: evidence of loss of chromosome 22 in tumour cells*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1994. **57**(10): p. 1245-1248.
10. Araki, A., et al., *Chromosome 1q gain and tenascin-C expression are candidate markers to define different risk groups in pediatric posterior fossa ependymoma*. Acta Neuropathologica Communications, 2016. **4**(1).
11. Johnson, R.A., et al., *Cross-species genomics matches driver mutations and cell compartments to model ependymoma*. Nature, 2010. **466**(7306): p. 632-636.
12. Witt, H., et al., *Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma*. Cancer Cell, 2011. **20**(2): p. 143-157.
13. Pajtler, K.W., et al., *Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups*. Cancer Cell, 2015. **27**(5): p. 728-743.
14. Mack, S.C., et al., *Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy*. Nature, 2014. **506**(7489): p. 445-450.
15. Pajtler, K.W., et al., *Molecular heterogeneity and CXorf67 alterations in posterior fossa group A (PFA) ependymomas*. Acta Neuropathologica, 2018. **136**(2): p. 211-226.
16. Mack, S.C., et al., *Therapeutic targeting of ependymoma as informed by oncogenic enhancer profiling*. Nature, 2018. **553**(7686): p. 101-105.
17. Cavalli, F.M.G., et al., *Heterogeneity within the PF-EPN-B ependymoma subgroup*. Acta Neuropathol, 2018. **136**(2): p. 227-237.
18. Ramaswamy, V. and M.D. Taylor, *Medulloblastoma: From Myth to Molecular*. Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(21): p. 2355-2363.
19. Pomeroy, S.L., et al., *Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression*. Nature, 2002. **415**(6870): p. 436-442.

20. Kool, M., et al., *Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e3088.
21. Alvarez-Buylla, A. and R.A. Ihrie, *Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **33**: p. 105-111.
22. Northcott, P.A., et al., *Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants*. J Clin Oncol, 2011. **29**(11): p. 1408-1414.
23. Cho, Y.J., et al., *Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome*. J Clin Oncol, 2011. **29**(11): p. 1424-1430.
24. Northcott, P.A., et al., *Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma*. 2009. **41**(4): p. 465-472.
25. Gibson, P., et al., *Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1095-1099.
26. Ellison, D.W., et al., *Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups*. Acta Neuropathol, 2011. **121**(3): p. 381-396.
27. Łastowska, M., et al., *ALK Expression s a novel marker for the wnt-activated type of medulloblastoma and indicator of good prognosis*. Am J Surg Pathol, 2017. **41**(41): p. 781-787.
28. Cambuzzi, E., *Medulloblastoma, WNT-activated/SHH-activated: clinical impact of molecular analysis and histogenetic evaluation*. Child's Nervous System, 2018. **34**(5): p. 809-815.
29. Makale, M.T., et al., *Mechanisms of radiotherapy-associated cognitive disability in patients with brain tumours*. Nature Reviews Neurology, 2017. **13**(1): p. 52-64.
30. Soussain, C., et al., *CNS complications of radiotherapy and chemotherapy*. The Lancet, 2009. **374**(9701): p. 1639-1651.
31. Northcott, P.A., et al., *The clinical implications of medulloblastoma subgroups*. Nat Rev Neurol, 2012. **8**(6): p. 340-351.
32. Ramaswamy, V., et al., *Medulloblastoma subgroup-specific outcomes in irradiated children: who are the true high-risk patients?* Neuro-Oncology, 2016. **18**(2): p. 291-297.
33. Ramaswamy, V., et al., *Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 821-831.
34. Ellison, D.W., et al., *Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups*. Acta Neuropathologica, 2011. **121**(3): p. 381-396.
35. Tamayo-Orrego, L. and F. Charron, *Recent advances in SHH medulloblastoma progression: tumor suppressor mechanisms and the tumor microenvironment*. F1000Research, 2019. **8**: p. 1823.
36. Carta, R., et al., *Cancer Predisposition Syndromes and Medulloblastoma in the Molecular Era*. Frontiers in oncology, 2020. **10**: p. 566822-566822.
37. Williams, J.R., et al., *A quantitative overview of radiosensitivity of human tumor cells across histological type and TP53 status*. 2008. **84**(4): p. 253-264.
38. Tchelebi, L., H. Ashamalla, and P.R. Graves, *Mutant p53 and the Response to Chemotherapy and Radiation*. 2014, Springer Netherlands. p. 133-159.
39. Frampton, J.E. and N. Basset-Séguin, *Vismodegib: A Review in Advanced Basal Cell Carcinoma*. Drugs, 2018. **78**(11): p. 1145-1156.
40. Robinson, G.W., et al., *Vismodegib Exerts Targeted Efficacy Against Recurrent Sonic Hedgehog-Subgroup Medulloblastoma: Results From Phase II Pediatric Brain Tumor Consortium Studies PBTC-025B and PBTC-032*. Journal of Clinical Oncology, 2015. **33**(24): p. 2646-2654.

41. Kimura, H., J.M.Y. Ng, and T. Curran, *Transient Inhibition of the Hedgehog Pathway in Young Mice Causes Permanent Defects in Bone Structure*. *Cancer Cell*, 2008. **13**(3): p. 249-260.
42. Tang, Y., et al., *Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition*. 2014. **20**(7): p. 732-740.
43. Houzelstein, D., et al., *Growth and Early Postimplantation Defects in Mice Deficient for the Bromodomain-Containing Protein Brd4*. 2002. **22**(11): p. 3794-3802.
44. Kool, M., et al., *Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas*. *Acta Neuropathologica*, 2012. **123**(4): p. 473-484.
45. Sengupta, S., D. Pomeranz Krummel, and S. Pomeroy, *The evolution of medulloblastoma therapy to personalized medicine*. *F1000Research*, 2017. **6**: p. 490.
46. Cho, Y.J., et al., *Integrative Genomic Analysis of Medulloblastoma Identifies a Molecular Subgroup That Drives Poor Clinical Outcome*. *Journal of Clinical Oncology*, 2010. **29**.
47. Venkataraman, S., et al., *Inhibition of BRD4 attenuates tumor cell self-renewal and suppresses stem cell signaling in MYC driven medulloblastoma*. *Oncotarget*, 2014. **5**(9): p. 2355-2371.
48. Kahn, S.A., et al., *Notch1 regulates the initiation of metastasis and self-renewal of Group 3 medulloblastoma*. *Nature Communications*, 2018. **9**(1).
49. Shih, D.J.H., et al., *Cytogenetic Prognostication Within Medulloblastoma Subgroups*. 2014. **32**(9): p. 886-896.
50. Lastowska, M., et al., *Medulloblastoma with transitional features between Group 3 and Group 4 is associated with good prognosis*. *J Neurooncol*, 2018. **138**(2): p. 231-240.
51. Sharma, T., et al., *Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes*. *Acta Neuropathologica*, 2019. **138**(2): p. 309-326.
52. Miller, S., et al., *Loss of INI1 Protein Expression Defines a Subgroup of Aggressive Central Nervous System Primitive Neuroectodermal Tumors*. *Brain Pathology*, 2013. **23**(1): p. 19-27.
53. Johann, P.D., et al., *Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors Are Comprised of Three Epigenetic Subgroups with Distinct Enhancer Landscapes*. *Cancer Cell*, 2016. **29**(3): p. 379-393.
54. Torchia, J., et al., *Integrated (epi)-Genomic Analyses Identify Subgroup-Specific Therapeutic Targets in CNS Rhabdoid Tumors*. *Cancer Cell*, 2016. **30**(6): p. 891-908.
55. Behdad, A. and A. Perry, *Central Nervous System Primitive Neuroectodermal Tumors: A Clinicopathologic and Genetic Study of 33 Cases*. *Brain Pathology*, 2010. **20**(2): p. 441-450.
56. Sturm, D., et al., *New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs*. *Cell*, 2016. **164**(5): p. 1060-1072.
57. Korshunov, A., et al., *Molecular analysis of pediatric CNS-PNET revealed nosologic heterogeneity and potent diagnostic markers for CNS neuroblastoma with FOXR2-activation*. *Acta Neuropathologica Communications*, 2021. **9**(1).
58. Han, H., et al., *BCOR-CCNB3 fusion-positive clear cell sarcoma of the kidney*. *Pediatric Blood & Cancer*, 2020. **67**(4).
59. Ueno-Yokohata, H., et al., *Consistent in-frame internal tandem duplications of BCOR characterize clear cell sarcoma of the kidney*. *Nat Genet*, 2015. **47**(8): p. 861-863.
60. Łastowska, M., et al., *Molecular identification of CNS NB-FOXR2, CNS EFT-CIC, CNS HGNET-MN1 and CNS HGNET-BCOR pediatric brain tumors using tumor-specific signature genes*. *Acta Neuropathologica Communications*, 2020. **8**(1).

61. Tabori, U., et al., *TP53 Alterations Determine Clinical Subgroups and Survival of Patients With Choroid Plexus Tumors*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(12): p. 1995-2001.
62. Merino, D.M., et al., *Molecular characterization of choroid plexus tumors reveals novel clinically relevant subgroups*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(1): p. 184-192.
63. Thomas, C., et al., *Methylation profiling of choroid plexus tumors reveals 3 clinically distinct subgroups*. Neuro Oncol, 2016. **18**(6): p. 790-796.
64. Hauser, P., *Classification and Treatment of Pediatric Gliomas in the Molecular Era*. Children, 2021. **8**(9): p. 739.
65. Qaddoumi, I., I. Sultan, and A. Gajjar, *Outcome and prognostic features in pediatric gliomas*. Cancer, 2009. **115**(24): p. 5761-5770.
66. Sturm, D., et al., *Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma*. Cancer Cell, 2012. **22**(4): p. 425-437.
67. Schwartzenuber, J., et al., *Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma*. Nature, 2012. **482**(7384): p. 226-231.
68. Mackay, A., et al., *Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma*. Cancer Cell, 2017. **32**(4): p. 520-537 e5.
69. Pollack, I.F., S. Agnihotri, and A. Broniscer, *Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions*. Journal of Neurosurgery: Pediatrics, 2019. **23**(3): p. 261-273.
70. Ellison, D.W., et al., *Histopathological grading of pediatric ependymoma: reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts*. Journal of Negative Results in BioMedicine, 2011. **10**(1): p. 1-13.
71. Kokkat, T.J., et al., *Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein*. Biopreserv Biobank, 2013. **11**(2): p. 101-106.
72. Broeckx, V., et al., *Formalin-fixed paraffin-embedded tissue: The holy grail of clinical proteomics? PROTEOMICS - Clinical Applications*, 2014. **8**(9-10): p. 735-736.
73. Bass, B.P., et al., *A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue How Well Do You Know Your FFPE Specimen?* Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2014. **138**(11): p. 1520-1530.
74. Kim, S., et al., *Deamination Effects in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples in the Era of Precision Medicine*. Journal of Molecular Diagnostics, 2017. **19**(1): p. 137-146.
75. Tsang, H.F., et al., *NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics*. Expert Rev Mol Diagn, 2017. **17**(1): p. 95-103.
76. Malkov, V.A., et al., *Multiplexed measurements of gene signatures in different analytes using the Nanostring nCounter™ Assay System*. BMC Research Notes, 2009. **2**(1): p. 80.
77. Geiss, G.K., et al., *Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(3): p. 317-25.
78. Kulkarni, M.M., *Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system*. Curr Protoc Mol Biol, 2011. **Chapter 25**: p. Unit25B.10.
79. Northcott, P.A., et al., *Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples*. Acta Neuropathol, 2012. **123**(4): p. 615-26.
80. Johann, P.D., et al., *Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors Are Comprised of Three Epigenetic Subgroups with Distinct Enhancer Landscapes*. Cancer Cell, 2016. **29**(3): p. 379-393.

81. Northcott, P.A., et al., *Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes*. Nature, 2012. **488**(7409): p. 49-56.
82. Ferris, S.P., et al., *High-grade neuroepithelial tumor with BCOR exon 15 internal tandem duplication—a comprehensive clinical, radiographic, pathologic, and genomic analysis*. Brain Pathology, 2020. **30**(1): p. 46-62.
83. Pajtler, K.W., et al., *Molecular heterogeneity and CXorf67 alterations in posterior fossa group A (PFA) ependymomas*. Acta Neuropathol, 2018. **136**(2): p. 211-226.
84. Northcott, P.A., et al., *Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples*. Acta Neuropathologica, 2012. **123**(4): p. 615-626.
85. Kim, S., et al., *Deamination Effects in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples in the Era of Precision Medicine*. J Mol Diagn, 2017. **19**(1): p. 137-146.
86. Bass, B.P., et al., *A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen?* Arch Pathol Lab Med, 2014. **138**(11): p. 1520-1530.
87. Zhang, P., et al., *The Utilization of Formalin Fixed-Paraffin-Embedded Specimens in High Throughput Genomic Studies*. International Journal of Genomics, 2017. **2017**: p. 1-9.
88. Narrandes, S. and W. Xu, *Gene Expression Detection Assay for Cancer Clinical Use*. Journal of Cancer, 2018. **9**(13): p. 2249-2265.
89. Ademuyiwa, F.O., et al., *Immunogenomic profiling and pathological response results from a clinical trial of docetaxel and carboplatin in triple-negative breast cancer*. Breast Cancer Research and Treatment, 2021. **189**(1): p. 187-202.
90. Hoyer, K., et al., *A genetically defined signature of responsiveness to erlotinib in early-stage pancreatic cancer patients: Results from the CONKO-005 trial*. EBioMedicine, 2021. **66**: p. 103327.
91. Lehman, N.L., et al., *Genomic analysis demonstrates that histologically-defined astroblastomas are molecularly heterogeneous and that tumors with MNI rearrangement exhibit the most favorable prognosis*. Acta Neuropathologica Communications, 2019. **7**(1).
92. Louis, D.N., et al., *cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading*. Brain Pathology, 2020. **30**(4): p. 844-856.
93. Nobre, L., et al., *Pattern of Relapse and Treatment Response in WNT-Activated Medulloblastoma*. Cell Reports Medicine, 2020. **1**(3): p. 100038.
94. Robinson, G.W., et al., *Risk-adapted therapy for young children with medulloblastoma (SJYC07): therapeutic and molecular outcomes from a multicentre, phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2018. **19**(6): p. 768-784.
95. Paret, C., et al., *Personalized therapy: CNS HGNET-BCOR responsiveness to arsenic trioxide combined with radiotherapy*. Oncotarget, 2017. **8**(69): p. 114210-114225.