

# Molekulárna genomika nádorových ochorení a jej perspektívy

RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, Bratislava

V posledných desiatich rokoch boli identifikované mnohé nové gény, ktorých mutácie sú kauzálne asociované so vznikom a s progresiou nádorových ochorení. Zároveň bola zaznamenaná vysoká úroveň nádorovej heterogenity, ktorá je zodpovedná za komplikácie spojené s optimalizáciou terapie nádorových ochorení. Tieto objavy priamo súvisia s implementáciou najmodernejších molekulárno-genetických metód analýzy nukleových kyselín, zastúpených najmä multiparalelným sekvenovaním, do výskumu v oblasti onkogenetiky. S ich využitím je možné simultánne identifikovať *driver* mutácie v mnohých tumor-asociovaných génoch, a detailne tak charakterizovať nádorovú heterogenitu tak z kvalitatívneho, ako aj kvantitatívneho pohľadu. Získané poznatky je možné všeobecne použiť pri dizajne nových liekov využiteľných v cielej terapii a individuálne v personalizácii terapie. Ďalším dôležitým benefitom je možnosť realizovať diagnostické a prognostické testy v neinvazívnom prevedení, pričom takéto testy už v pilotných štúdiách preukázali vysokú špecifitu a dokonca vyššiu senzitivitu v porovnaní s invazívnymi testami.

**Kľúčové slová:** exóm, genóm, tumor-asociované gény, evolúcia nádoru, multiparalelné sekvenovanie, neinvazívne genetické testy.

## Molecular genomic of cancer diseases

In the last decade lot of novel genes, which mutations were found to be causally associated with cancer development and progression, were identified. Simultaneously, high level of cancer heterogeneity, which is responsible for most important complications linked with optimisation of cancer therapy, was recorded. These discoveries were directly related to the implementation of state-of-art molecular-genetic methods of analysis of nucleic acids, with multiparallel sequencing be the most prominent, in the oncogenetic research. With their utilisation parallel identification of driver mutations in multiple cancer genes and so comprehensive molecular characterisation of cancer heterogeneity was enabled from qualitative as well as quantitative point of view. The gained knowledge is possible to be used in common in design of novel target therapy agents and individually in personalisation of cancer therapy. Additional important benefit is the possibility to perform diagnostic and prognostic tests in noninvasive settings, as such testing showed in pilot studies concordantly high specificity and even higher sensitivity in direct comparison with invasively performed tests.

**Keywords:** exome, genome, cancer genes, tumor evolution, multiparallel sequencing, noninvasive genetic testing.

## Úvod

Vo vyspelom svete je incidencia nádorových ochorení 1 : 3, pričom vo viac ako polovici prípadov je toto ochorenie smrteľné. Spoločnou charakteristikou nádorových ochorení je, že sú dôsledkom abnormalít na úrovni DNA, a preto sú nádorové ochorenia všeobecne najčastejším genetickým ochorením ([https://www.sanger.ac.uk/research/projects/cancergenome/#t\\_research](https://www.sanger.ac.uk/research/projects/cancergenome/#t_research), 2014-08-25). Od identifikácie prvej somatickej mutácie – p. G12V v géne *HRAS* nádorovej bunkovej línie T24/EJ1 ubehlo viac ako 30 rokov (1). V dvoch nasledujúcich dekádach po tomto objave bolo publikovaných množstvo prác, v ktorých boli identifikované s nádorovými ochoreniami asociované mutácie v desiatkach génov. V roku 2004 počet génov zapojených do vzniku a rozvoja nádorových ochorení dosiahol 291 (2). Po roku 2005 sa pri analýzach začala uplatňovať technológia multiparalelného sekvenovania (MPS), známa aj ako sekvenovanie novej generácie (NGS – next generation sequencing), ktorá v súčasnosti predstavuje jeden z hlavných nástrojov štúdia v oblasti onkogenetiky. Výsledkom implementácie MPS

do výskumu v oblasti onkogenetiky sú nielen tisíce analyzovaných vzoriek nádorov, ale najmä navýšenie počtu tumor-asociovaných génov, ktorý v súčasnosti presiahol 520 (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/census/>, 2014-08-25). V súčasnosti naďalej prebieha Cancer genome project, ktorého hlavnou úlohou je identifikovať nové gény zapojené do onkogenézy, pričom ako hlavný nástroj ich identifikácie slúžia práve metódy založené na MPS.

## Príčiny onkogenézy

Je známe, že genóm každej nádorovej bunky nesie viaceré somatické mutácie, ktoré sú najčastejšie podľa kategorizácie mutácií chromozómové prestavby, substitúcie, inzercie/delécie, variácie počtu kópií (CNV) a epigenetické zmeny (obrázok 1) (3).

Spomedzi somatických mutácií je pre rozvoj nádorového ochorenia najdôležitejšia skupina tzv. *driver* mutácií, ktoré poskytujú nádorovým progenitorovým bunkám selektívnu výhodu a sú pre onkogenézu rozhodujúce. V nadväznosti na známe funkcie génov, v ktorých sa *driver* mutácie

Onkológia (Bratisl.), 2014; roč. 9(5): 292–295

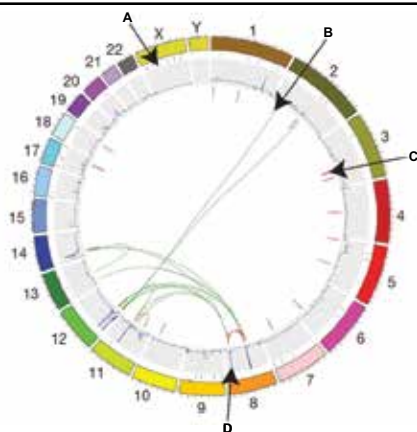
v nádoroch vyskytujú, bolo možné identifikovať základné bunkové mechanizmy, ktorých onkogénne zmeny umožňujú vznik a progresiu nádorových buniek v organizme. V súčasnosti sa za všeobecne aplikovateľnú schému onkogenézy považuje schéma, pri ktorej sú *driver* mutácie lokalizované v génoch, ktoré sú v bunkách zapojené do procesov:

- bunkovej proliferácie,
- bunkovej rastovej supresie,
- imunitným systémom navodenej deštrukcie buniek,
- kontroly replikatívneho potenciálu buniek,
- bunkovej adhezivity a mobility,
- indukcie angiogenézy,
- signalizácie bunkovej smrti,
- regulácie bunkového metabolizmu (4).

## Nádorová heterogenita a identifikácia nových génov asociovaných s onkogenézou

V dôsledku vysokej úrovne molekulárnej redundancie v bunkových signalizačných dráhach a evolúcie prebiehajúcej na úrovni jednotlivých nádorov (náhodne alebo pod selekčným tla-

**Obrázok 1.** Circos plot genomických zmien identifikovaných v bunkovej línii malobunkového nádoru pľúc

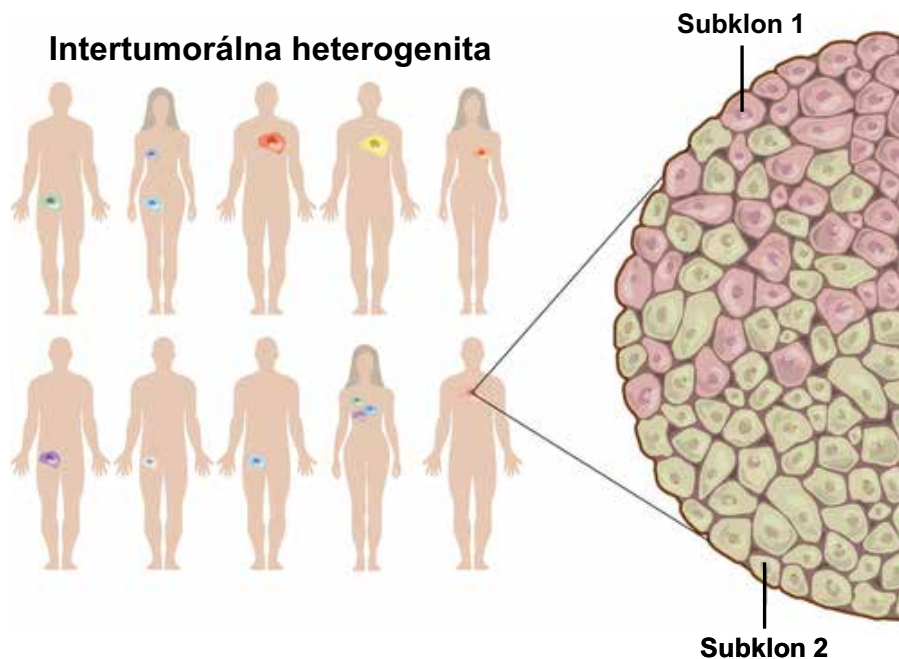


Vysvetlivky: A – substitúcie a inzercie/delécie, B – interchromozómové prestavby, C – intrachromozómové prestavby, D – variácie počtu kópií (CNV) (3)

kom prebiehajúcej terapie) sa v onkogenéze pri rôznych typoch nádorových ochorení v rámci jedného typu nádorového ochorenia, respektíve v rámci primárnych ložísk a odvodených metastáz, vyskytujú rôzne *driver* mutácie v rôznych génoch. Tento jav vo výsledku vedie k vysokej inter- a intratumorálnej heterogenite, ktorá je významnou komplikáciou personalizovanej nádorovej medicíny (obrázok 2) (5).

V nedávnej štúdii realizovanej MPS analýzou exómov takmer 5 000 pacientskych duálnych vzoriek (nádor/zdravé tkanivo) so zameraním sa na identifikáciu génov zapojených do onkogenézy v 21 najčastejších typoch nádorových ochorení boli identifikované mutácie v 224 unikátnych génoch. V analyzovaných typoch nádorov boli sumárne identifikované mutácie v priemere v 10 rôznych génoch, pričom 7 typov malo mutácie v menej než 10 génoch a dve vo viac ako 30 génoch (rozptyl – 1 – 58 génov, medián – 13 génov). Dôležitým výsledkom potvrdzujúcim vysokú úroveň intertumoralnej heterogenity bolo zistenie, že len 22 z týchto 224 génov bolo mutovaných v troch a viacerých typoch nádorov, pričom všeobecne známe tumor-asociované gény – *TP53*, *PIK3CA*, *PTEN*, *RB1*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *CDKN2A*, *FBXW7*, *ARID1A*, *MLL2* a *STAG2* boli identifikované v štyroch a vo viac typoch nádorov, kým mutácie vo zvyšných 10 génoch (*ATM*, *CASP8*, *CTCF*, *ERBB3*, *HLA-A*, *HRAS*, *IDH1*, *NF1*, *NFE2L2* a *PIK3R1*) boli identifikované v troch typoch nádorov (6). V inej recentnej štúdii zameranej na identifikáciu somatických mutácií na detekciu intratumoralnej heterogenity 63 – 69 % somatických mutácií nebolo identifikovaných vo všetkých vzorkách získaných z jednotlivých primárnych nádorov, respektíve z ich rôznych častí a od nich odvodených metastáz získaných

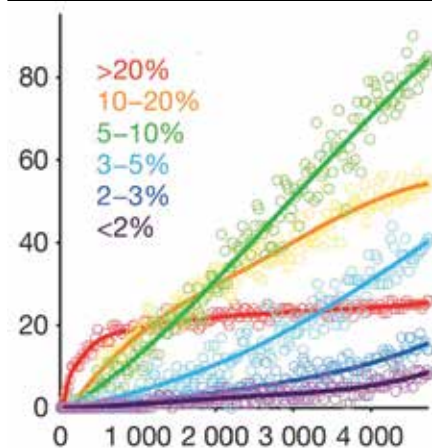
**Obrázok 2.** Schéma inter- a intratumorálnej heterogenity (5)



## Intratumorálna heterogenita

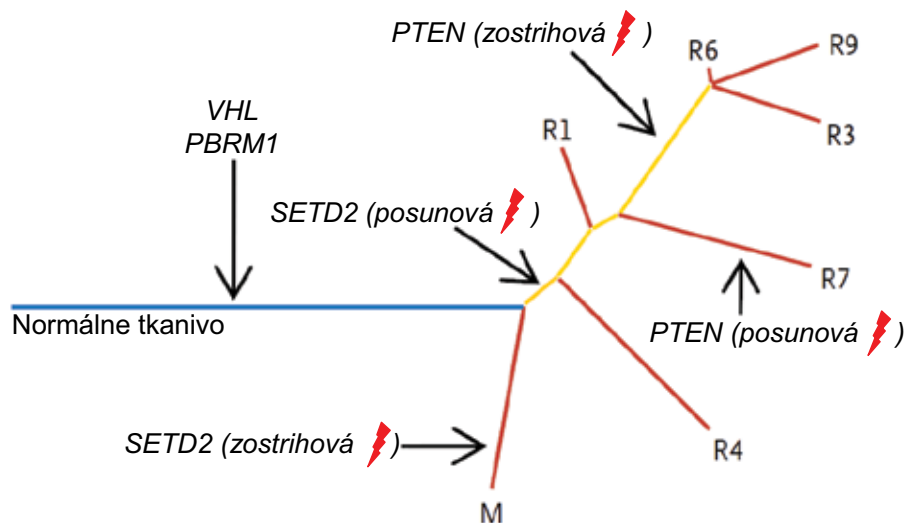
od jednotlivých pacientov (7). Medzi najlepšie preštudované onkologické ochorenia s najvyššou inter- a intratumorálnou heterogenitou patrí rakovina prsníka. V štúdiu Lawrence et al. (6) spomenutej vyššie bolo analyzovaných takmer 900 duálnych vzoriek od pacientov s nádorom prsníka. Výsledky potvrdili prítomnosť mutácií asociovaných s ochorením v 32 už predtým známych génoch a vďaka inovatívnemu prístupu v analýze údajov zahŕňajúcemu aj krížovú analýzu s inými typmi nádorových ochorení a frekvenciu mutácií špecifickú pre daný typ nádoru a pacienta MutSig (8) v štúdiu identifikovali ďalších 5 génov, ktorých mutácie boli signifikantne asociované s výskytom nádorov prsníka. Pri zvyšných 20 typoch nádorov bolo identifikovaných spolu až 122 nových génov asociovaných s onkogenézou (medián – 6 génov/typ nádoru). Zároveň vďaka veľkému rozsahu analyzovaného súboru dokázali štatistickými metódami odhadnúť rozsah štúdií potrebných na dosiahnutie saturácie identifikácie génov, v ktorých sú *driver* mutácie prítomné. V prípade génov, v ktorých sa *driver* mutácie vyskytujú v nádoroch s vysokou frekvenciou (> 20 %), sa saturácia dosahuje už v rozsahu realizovanej štúdie, keďže krivka opisujúca nárast identifikácie génov dosiahla plató a identifikácia nových génov je málo pravdepodobná (obrázok 3 – červená krivka). V kategórii génov, v ktorých sa *driver* mutácie vyskytujú so strednou frekvenciou, konkrétne v rozsahu 10 – 20 %, vidieť zníženie prírastku identifikovaných génov po analýze 4 000 vzoriek, čo predstavuje dobrý predpoklad

**Obrázok 3.** Saturácia analýza identifikácie génov asociovaných s onkogenézou v rámci štúdie na takmer 5 000 duálnych vzorkách od pacientov s 21 typmi nádorových ochorení. Na osi X je počet analyzovaných duálnych vzoriek, na osi Y je počet identifikovaných génov. Farebne odlišené krivky korešpondujú s krivkou saturácie pre percentuálne kategórie génov, v ktorých sa vyskytujú *driver* mutácie s vysokou (> 20 %), respektíve strednou frekvenciou (2 – 20 %) (6)



spomalenia nárastu a priblíženia sa k fáze saturácie (obrázok 3 – žltá krivka). Pri zvyšných kategóriách reprezentujúcich gény s *driver* mutáciami v rozsahu 2 – 10 % sa však predpokladá, že bude potrebné analyzovať exómy 2 000 duálnych vzoriek pre každý až z 50 rôznych typov nádorov, čo sumárne znamená 200 000 exómových analýz. Na identifikáciu génov s *driver* mutáciami s nízkou (< 2 %) frekvenciou bude potrebné analyzovať ešte výrazne väčší súbor vzoriek (obrázok 3 – zvyšné krivky) (6).

**Obrázok 4.** Evolučný strom zostavený na základe prítomnosti driver mutácií v génoch asociovaných s daným typom tumoru a príslušnosti vzoriek k rôznym regiónom primárneho nádoru (7)



Vysvetlivky: R1 – R9 – regióny 1 – 9, M – metastáza

Z uvedeného vyplýva, že vďaka najmodernejšiemu prístupu v genomických analýzach budú v blízkej budúcnosti identifikované mnohé nové gény, ktorých asociácia s onkogenézou doteraz nebola preukázaná a ktoré môžu byť v budúcnosti použité na personalizáciu liečby a identifikáciu terapiou zasiahnuteľných cieľových molekúl. Pri pohľade do blízkej budúcnosti sa však vynára otázka možnosti aktuálnej translácie výsledkov mutačných analýz do nových liečebných stratégií. Limitáciou totiž môže byť nedostatočný repertoár a dostupnosť nových liečiv. Až tri štvrtiny zo zoznamu liekov schválených na liečbu rôznych typov nádorových ochorení bolo v zozname FDA už v roku 2004, teda pred nástupom genomických analýz. Pozitívnym markerom je však zoznam liekov v testovaní, v ktorom je až polovica nových látok a existuje predpoklad, že tieto sú práve výsledkom objavov získaných s využitím genomických analýz (9).

### Genomika v diagnostike a cielej terapii nádorových ochorení

V nadväznosti na vysokú genetickú heterogenitu nádorov medzi pacientmi, primárneho nádoru a od neho odvodených metastáz, respektíve nádorových subklonov v rámci jedného primárneho nádoru, je otázne, či nie je v diagnostike a rozhodovaní o optimálnej terapii správny čas posunúť sa od genetických testov ku genomickým.

Kontinuálny zisk rôznych mutácií a klonálna amplifikácia počas onkogenézy má za následok vznik súboru geneticky odlišných subklonov v nádore, ktoré je možné prezentovať vo forme evolučného stromu. V rámci tejto evolučnej

štruktúry metastatické bunky môžu pochádzať z malých subklonov primárneho tumoru, pričom rôzne oblasti primárneho tumoru môžu niesť rozdielne mutácie v rovnakom géne zodpovedajúce tak uplatneniu sa konceptu konvergentnej evolúcie v rámci onkogenézy (obrázok 4) (7).

Výsledkom evolučného procesu nádorových buniek je, že pre tumorálnu heterogenitu nie je možné optimalizovať terapeutické postupy bez komplexnej mutačnej analýzy mnohých génov asociovaných s daným typom nádoru. Tým sa namiesto genetickej analýzy zameranej na jednotlivé gény do popredia dostáva genomická analýza. Táto je v súčasnosti reprezentovaná najmä cieľným resekvenovaním panelov génov vybraných pre daný typ nádoru alebo univerzálnejšou analýzou exómu. Navyše genomickým prístupom s využitím MPS je možné realizovať nielen kvalitatívne, ale aj kvantitatívne analýzy, ktoré umožňujú sledovať nielen mutačnú evolúciu nádoru, ale aj príslušné kvantitatívne zmeny v hmote nádorov špecifického genotypu, a tak reagovať napríklad na vznik rezistencie na práve prebiehajúcu terapiu (10). Aktuálne limitácie paušálneho zavádzania MPS do klinickej praxe súvisia s dostupnou NGS technológiou vykazujúcou 0,1 % – 1 % chybovosť z pohľadu získanej sekvencie (<http://www.molecularecologist.com/next-gen-table-3c-2014>, 2014-09-16), a tiež v bioinformatickej analýze získaných údajov. V štúdiu Wang et al. (11) bola napríklad zaznamenaná 5,0 % a 19,1 % frekvencia výskytu falošne identifikovaných jednonukleotidových zámen vo vzorkách od pacientov s melanómom a nádormi pľúc pri použití celkovo najvyššie hodnoteného bioinformatického analyzačného nástroja VarScan2 (11).

### Neinvazívna analýza nádorovej DNA

Súčasne so zväčšovaním rozsahu mutačných analýz je dôležité si uvedomiť, že v prípade vysokej úrovne nádorovej heterogenity môže analýza len časti nádorového tkaniva získaného biopsiou poskytnúť skreslené výsledky o genetickej charakteristike nádoru a následne viesť k suboptimálnej terapii ochorenia (12, 13). Preto je na komplexnú genomickú analýzu potrebné zvoliť iný zdroj biologického materiálu, ktorý umožňuje získanie reprezentatívneho pohľadu na mutačný status subklonov primárneho nádoru, respektíve metastáz. Ako vhodný zdroj na reprezentatívnu genomickú mutačnú analýzu sú v súčasnej literatúre uvádzané cirkulujúce tumorové bunky (CTC) a cirkulujúca tumorová DNA (ctDNA). Existuje viacero charakteristík, ktorých výsledkom je preferencia ctDNA na genomické mutačné analýzy. Tieto sú tak technického, ako aj biologického rozmeru. Medzi technické charakteristiky vedúce k preferencii ctDNA patria jednoduchšia a ekonomickejšia príprava vzoriek, keďže sa nevyžaduje dodatočné spracovanie vzoriek po odbere a pred izoláciou nukleových kyselín. Spomedzi biologických charakteristík bola zaznamenaná vyššia senzitivita detekcie tumor-špecifických mutácií pri zachovaní vysokej konkordancie výsledkov mutačných analýz so simultánne analyzovanými vzorkami z nádorového tkaniva pri priamom porovnaní analýz vychádzajúcich z CTC a ctDNA (14). Genomické analýzy založené na MPS a cieľných molekulárno-genetických testoch využívajúcich ctDNA pri diagnóze a prognóze nádorových ochorení, respektíve sledovaní priebehu ich terapie, už preukázali vysokú senzitivitu, špecifickosť a konkordanciu s analýzami vzoriek z nádorových tkanív v retrospektívnych aj prospektívnych štúdiách (10, 15 – 17). V štúdiu Oxnarda et al. (17) bolo možné s využitím cieľných molekulárno-genetických analýz (založených na digitálnej PCR) neinvazívne identifikovať prítomnosť nových subklonov rezistentných na prebiehajúcu liečbu nádorov pľúc s mutáciami v EGFR erlotinibom už 16 týždňov pred tým, ako bola progresia zaznamenaná rádiografickými metódami.

### Záver

Molekulárno-genetický výskum v oblasti onkologických ochorení priniesol za posledných desať rokov mnohé nové objavy a informácie o génoch, ktorých mutácie sú kľúčové pre vznik a progresiu nádorových buniek. Nárast množstva informácií priamo súvisí s dostupnosťou nových technológií a prístupov v analýze vzoriek, pričom do popredia sa dostávajú vysoko-

výkonné metódy genomickej analýzy, akými sú multiparalelné sekvenovanie a metódy umožňujúce analýzu jednotlivých molekúl DNA, akou je napríklad digitálna PCR. Zároveň s novými laboratórnymi metódami sa pri získavaní nových poznatkov uplatňujú aj nové bioinformatické a štatistické postupy analýzy získaných údajov vedúce k identifikácii nových génov kauzálnych asociovaných s nádorovými ochoreniami. Tieto nové objavy sa už v súčasnosti prejavujú v identifikácii nových terapeutických cieľov a na ich podklade prebiehajú aj nové klinické štúdie s kandidátnymi experimentálnymi liekmi, ktoré môžu v budúcnosti viesť k výrazne vyššej úrovni personalizovanej medicíny. Navyše viaceré pilotné štúdie z posledného obdobia poukazujú na možnosť neinvazívneho prístupu v diagnostike a prognostike nádorových ochorení, čoho dôsledkom môže byť výrazne skorší záchyt vzniku a progresie ochorenia, respektíve vznikajúcej rezistencie na prebiehajúcu terapiu, keď správny a cieleň terapeutický zásah, respektíve optimalizácia prebiehajúcej terapie, bude viesť k významnému predĺženiu času bez progresie ochorenia a prežívania pacientov s nádorovými ochoreniami. Zároveň však aj vďaka dostupnosti nových laboratórných technológií zisťujeme, aké množstvo poznatkov ešte bude potrebné v budúcnosti získať, aby bolo možné dôkladne opísať genetickú heterogenitu nádorových ochorení a následne získané poznatky využiť v klinickej praxi.

## Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Výskum a vývoj pre projekt REVOGENE – Výskumné centrum molekulárnej genetiky, kód ITMS 26240220067, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## Literatúra

1. Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*. 1982;300(5888):149–152.
2. Futreal PA, Coin L, Marshall M, et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(3):177–183.
3. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719–724.
4. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309–322.
5. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013;501(7467):338–345.
6. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014;505(7484):495–501.
7. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883–892.
8. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214–218.
9. Wheeler DA, Wang L. From human genome to cancer genome: the first decade. *Genome Res*. 2013;23(7):1054–1062.
10. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013;497(7447):108–112.
11. Wang Q, Jia P, Li F, et al. Detecting somatic point mutations in cancer genome sequencing data: a comparison of mutation callers. *Genome Med*. 2013;5(10):91.

12. Gerlinger M, Swanton C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer*. 2010;103(8):1139–1143.

13. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*. 2011;3(75):75ra26.

14. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res*. 2012;18(8):2391–2401.

15. Chan KC, Jiang P, Zheng YW, et al. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clin Chem*. 2013;59(1):211–224.

16. Kukita Y, Uchida J, Oba S, et al. Quantitative identification of mutant alleles derived from lung cancer in plasma cell-free DNA via anomaly detection using deep sequencing data. *PLoS One*. 2013;8(11):e81468.

17. Oxnard GR, Pawelczak CP, Kuang Y, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res*. 2014;20(6):1698–1705.

**RNDr. Gabriel Minárik, PhD.**

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK  
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava  
gabriel.minarik@gmail.com