

# Molekulární profilování nádorů plic

Marek Minárik<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centrum aplikované genomiky solidních nádorů (CEGES), Genomac výzkumný ústav, s.r.o., Praha

<sup>2</sup>Interní klinika 1. LF UK a ÚVN VFN Praha

Vznik a progres plicních karcinomů je stejně jako u ostatních solidních nádorů provázena celou řadou poruch (mutací) genomu. Tyto často charakteristické poruchy představují molekulární markery a jejich vyšetřování se stalo dnes již neodmyslitelnou součástí diagnosticko-terapeutického procesu. Doplnění klasické histopatologické klasifikace založené na morfologii o informaci o molekulárním profilu se stává zcela klíčovým nástrojem pro predikci úspěšnosti protinádorové léčby i odhadu prognózy onkologických pacientů. Novým směrem v moderní patologické diagnostice je metoda tzv. *tekuté biopsie*, neboli vyšetřování nádorových buněk a nádorové DNA uvolněných do periferního oběhu pacienta.

**Klíčová slova:** karcinom plic, NSCLC, SCLC, tekutá biopsie, CTC, ctDNA.

## Molecular profiling of lung cancer

As in other solid tumours, the development and progression of lung cancer is accompanied by a whole number of genome disorders (mutations). These often characteristic disorders represent molecular markers and their investigation has now become an inseparable part of the diagnostic-therapeutic process. Supplementing the conventional morphology-based histopathological classification with information on the molecular profile is becoming a completely crucial tool for predicting the success rate of anticancer treatment as well as estimating the prognosis of cancer patients. A new trend in modern pathological diagnosis is the method of so-called liquid biopsy, or the investigation of cancer cells and tumour DNA released into the patient's peripheral circulation.

**Key words:** lung cancer, NSCLC, SCLC, liquid biopsy, CTC, ctDNA.

Genomika a molekulární patologie jsou termíny, které dnes již neodmyslitelně patří do procesu diagnostiky a terapie karcinomu plic (1, 2). Termínem *Nádorová genomika* většinou rozumíme oblast výzkumu mechanismů, které na úrovni genomu provázejí vznik a vývoj nádorového onemocnění. Naproti tomu obor *Molekulární patologie* využívá výsledky takových výzkumů, které jsou přeneseny či přeloženy (z anglického *translational science/medicine*) do klinické praxe. *Nádorová genomika* se zabývá studiem patologických strukturních poruch vyskytujících se v nádorovém genomu a jejich následným dopadům na fungování buněčných systémů v procesu vzniku a proliferace nádoru (3). Prvně zmíněná, *strukturní*, část nádorové genomiky se zaměřuje na nalézání (i) změn v pořadí či počtu

jednotlivých bází, obecně označovaných jako genové mutace, (ii) větších přeskupení delších sekvenčních úseků, označovaných jako strukturní variace, nebo (iii) změn ve struktuře nebo počtu celých chromozomů, tzv. chromozomálních mutací. Neodmyslitelnou součástí této části je též oblast zaměřena na vývoj a aplikaci souvisejících metodik a nových technologií, především v oblasti DNA sekvenování. Druhá, *funkční*, část nádorové genomiky dává tyto strukturní poruchy do kontextu fungování buněčných procesů na základě využití modelových systémů (4) a výsledky těchto studií jsou základem vývoje nových protinádorových terapeutik (5).

K masivnímu využití molekulárních vyšetření jako komplementu standardního histopatologického hodnocení došlo především v důsledku

bouřlivého rozvoje v oblasti metodiky a postupů využívaných v genomické analýze solidních nádorů (6). Původní klasické metody vyšetřování senzitivních mutací často vyžadující použití laserové mikrodisekce v zájmu obohacení nádorových buněk v preparátech, byly postupně zcela nahrazeny specializovanými technikami s vysokou citlivostí zachytu mutovaných alel. Z pohledu rozšíření metodik používaných v současnosti pro rutinní klinickou praxi jsou to postupy využívající sekvenčně specifickou PCR přednostně amplifikující mutované sekvence, v menší míře pak sekvenčně specifickou hybridizaci či metody sekvenování nové generace (next-generation sequencing, NGS) (7). Využití metod NGS je naopak v současnosti zcela zásadní právě v oblasti *Nádorové genomiky*, především při mapování

komplexních molekulárních profilů nádorů a pro nalézání nových prediktivních markerů cílené biologické léčby a prognostických markerů biologického chování nádoru, umožňujících odhad přežití pacientů (viz dále).

U plicních karcinomů jsou nejčastěji vyšetřovanými molekulárními markery bodové (jednonukleotidové) mutace a krátké inserce či delece, avšak studovány jsou i další poruchy. Přehled je uveden v tabulce 1.

## Somatické poruchy v plicních nádorech

Nedávné studie srovnávající četost somatických poruch u různých solidních nádorů prokázaly, že s výjimkou melanomu mají plicní nádory největší mutační zátěž (mutation burden) vyjádřenou jako průměrný počet mutací na tisíc bází nádorové DNA. U plicních adenokarcinomů byla střední hodnota 10 mutací, u skvamózních karcinomů to bylo ještě dvakrát více (8). Důvodem je časté dělení buněk plicních tkání a vysoká mutační frekvence postihující tyto buňky, obojí v důsledku přímé expozice působení vnějších karcinogenů.

Přestože hodnota mutační zátěže vyjadřuje celkový obraz poškození DNA, zdaleka ne všechny mutace mají stejnou roli v procesu nádorové iniciace a progresu. Z hlediska molekulárních mechanismů těchto pochodů jsou tak rozlišovány mutace, které jednoznačně zapříčiňují další nekontrolované dělení a růst a naopak mutace, které vznikají například pouze následkem nedůsledné kontroly přepisu DNA (proofreadingem), avšak které nemají na další destabilizaci buněčné homeostázy výrazný vliv. Pro první skupinu se vžil název „driver mutations“ a současně i geny, které tyto mutace často obsahují, bývají označovány jako „driver genes“. Mutace, které nemají zásadní význam pro nádorovou proliferaci se pak označují jako „passenger mutations“ a jimi postižené geny jako „passenger genes“ (9). Ze zhruba 2 000 genů, jejichž poruchy byly detekovány v solidních nádorech, bylo doposud experimentálně potvrzeno 138 genů označovaných jako „driver“, z toho 64 onkogenů a 74 tumor supresorových genů (10).

V plicních nádorech byla identifikována celá řada „driver“ mutací, které způsobují permanentní aktivaci především (proto)onkogenů vedoucí ke stimulaci buněčného dělení a růstu. Tyto geny jsou členy významných signálních drah

růstových faktorů, nejčastěji jde o membránové receptory přenášející signál generovaný vnější stimulací na buněčné membráně dovnitř buňky. Nejznámější z těchto tzv. receptor tyrozin kináz (RTK) nesoucí poruchy u plicních nádorů jsou geny *EGFR*, *ALK*, *HER2*, *ROS1*, *MET*, *PDGFR* a *VEGFR*. Dalšími z často postižených jsou intracelulární přenašeče těchto signálů, především (proto)onkogeny *KRAS*, *BRAF* a *PIK3CA*. Spektrum mutovaných genů často odráží rozdíly v morfologii a biologickém chování nádorových podtypů, jak je vidět z obrázku 1 znázorňujícího procentuální zastoupení mutací genů pro nejčastější podtypy NSCLC.

## Molekulární prediktory onkologické léčby plicních karcinomů

Jak již bylo zmíněno výše, patologická aktivace onkogenů vede k permanentní stimulaci signálů buněčného růstu a je jedním z průvodních jevů nádorové proliferace. Tyto geny tak současně představují cíle pro biologickou léčbu zaměřenou na blokaci těchto drah. Od prvního odhalení významu přítomnosti aktivujících mutací genu *EGFR* pro pozitivní odpověď nemalobuněčných karcinomů na léčbu nízkomolekulárními inhibitory tyrozin kináz před 11 lety, došlo k výraznému posunu v porozumění mechanismu účinku cílených biologických léčiv. Klasické spektrum typů plicních nádorů dle histopatologické klasifikace tak bylo významně rozšířeno o tyto další molekulární subtypy. Kromě již zmíněných *EGFR*-pozitivních nádorů citlivých na anti-*EGFR* terapii (gefitinib, erlotinib, afatinib) mezi ně u NSCLC patří nádory nesoucí fúzní produkty genu *ALK* a amplifikace genů *ROS1*, které obojí vykazují citlivost na blokátory c-MET signalizace (crizotinib). Tyto subtypy jsou často nalézány především u adenokarcinomů a v současnosti rutinně aplikovány v terapii NSCLC. Dalšími subtypy jsou nádory nesoucí amplifikace *RET1*, které jsou primárními kandidáty pro

terapii na bázi inhibice *RET1* a *VEGFR* (vandetanib, sorafenib, sunitinib). Naopak u skvamózních typů lze vysledovat charakteristické podtypy vykazující amplifikace a mutace *PIK3CA* nebo mutace *PTEN*, obojí představující významné potenciální cíle pro inhibitory zaměřené na PI3K/AKT/mTOR signalizaci (everolimus, temsirolimus). V neposlední řadě jsou to i skvamózní nádory nesoucí amplifikace genu růstového faktoru *FGFR1* citlivé na nově vyvinuté anti-FGFR preparáty (ponatinib, dovitinib).

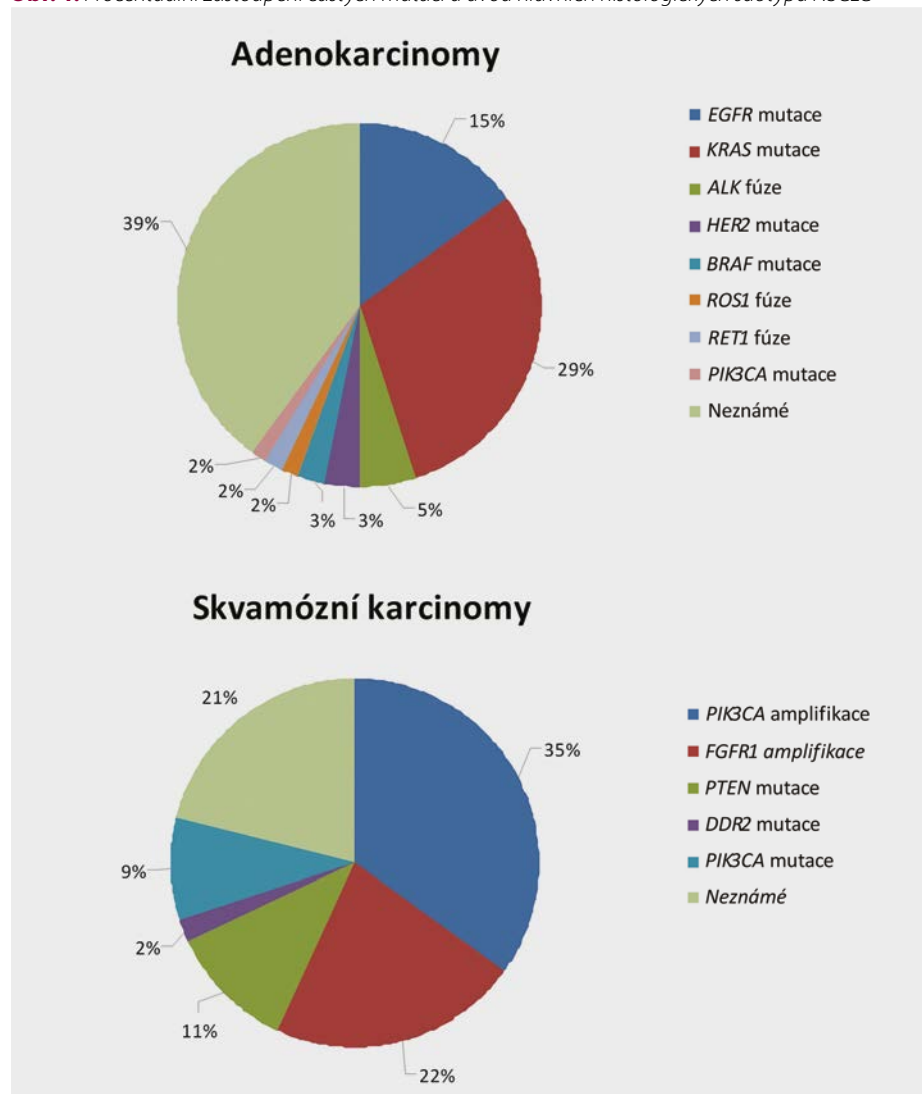
U SCLC měly doposud snahy o vývoj cílené biologické léčby smíšené výsledky. I zde je však v současné době již v testování několik biologicky cílených přípravků, jejichž účinnost je závislá na molekulárním profilu nádoru (11). Jedná se například o testování anti-PDGFR signalizace imatinib mesylátem účinným u nádorů nesoucích mutace genu *PDGFR1* nebo c-Kit a dále také pokračující vývoj preparátů inhibujících již zmíněné základní proliferativní signální dráhy, jako např. *EGFR*, *VEGFR* nebo mTOR, kde lze předpokládat významnost stejných molekulárních prediktorů jako u NSCLC.

## Technologie tekuté biopsie

Pokud hovoříme o současném stavu a směřování molekulárního profilování karcinomů plic, je třeba zmínit nastupující trend, kterým se toto profilování provádí nikoli ze vzorků tkáně, ale s využitím elementů uvolněných z nádoru do periferního oběhu. Pro tento postup se zavedlo označení *tekutá biopsie* a její hlavní význam spočívá v možnosti vyšetření v případech, kdy nelze vzorek tumorózní tkáně získat ať již z důvodu nedostupnosti či negativního dopadu na pacienta. Jednou takovou možností je vyšetřování tzv. cirkulujících nádorových buněk (circulating tumor cells, CTC), které se odloučily z tumorózní masy, druhou potom vyšetřování cirkulující nádorové DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) uvolňované z jednotlivých nádorových buněk (12).

Tab. 1. Molekulární markery v genomice a molekulární patologii plicních nádorů

Marker	Časté označení	Typické využití v klinické praxi	Vyšetřované geny
Bodová (jednonukleotidová) mutace	Mut SNV	Predikce léčebné odpovědi Odhad prognózy onemocnění	<i>EGFR</i> <i>KRAS</i> <i>BRAF</i>
Krátké inserce, delece a duplikace	Indels	Predikce léčebné odpovědi	<i>EGFR</i>
Změny v počtu kopií exonů/genů	Ampl	Predikce léčebné odpovědi	<i>ROS1</i> <i>cMET</i>
Strukturní varianty, aneuploidie, fúze	SV	Predikce léčebné odpovědi	<i>EML4-ALK</i>
Epigenetické poruchy	CpG, CIMP	Odhad prognózy onemocnění	<i>MGMT</i> <i>CDKN2A</i>

**Obr. 1.** Procentuální zastoupení častých mutací u dvou hlavních histologických subtypů NSCLC

CTC buňky poskytují kompletní obraz nádoru a mohou být kultivovány pro potřeby testování lékové rezistence. V době nastupující nové generace protinádorové imunoterapie se tak CTC jeví jako zcela neocenitelný zdroj pro testování exprese (trans)membránových proteinů CTLA4, PD-1 nebo PD-L1 jako potenciálních prediktivních biomarkerů (13). Je však třeba zmínit, že v současné době je pro získání CTC vzhledem k velmi nízké koncentraci (jednotky CTC na ml odebrané krve) potřeba nákladných

technologií (14, 15). Vyšetřování ctDNA, které je založeno na cílené detekci genových poruch v krátkých fragmentech DNA, poskytuje pouze informaci o genových poruchách, avšak je technologicky dostupnější (16). Navíc, výsledek vyšetření ctDNA je jakýmsi směsným molekulárním profilem všech nádorových ložisek (primárních i sekundárních) a dává tedy celkový obraz o probíhající onemoci (17). Významný potenciál má i možnost opakovaných tekutých „re-biopsií“ aktuálního nádorového profilu i v průběhu trvání

onkologické léčby, a to až již za účelem sledování hladin mutace, na kterou je léčba zacílena, nebo za účelem časného záchytu nové mutace indikující nástup léčebné rezistence (např. mutace T790M v exonu 20 genu *EGFR*).

Je třeba si uvědomit, že *tekutá biopsie* není univerzálně použitelná u všech onkologických pacientů. K uvolňování CTC i ctDNA dochází zejména u objemných nádorových mas v pokročilých stádiích onemocnění. Například u plicních karcinomů lze v současné době běžně dostupnými postupy vyšetřit molekulární profil ctDNA u zhruba poloviny pacientů ve IV. stadiu onemocnění (18). Lze očekávat, že s využitím nově vyvíjených specializovaných technologií např. na bázi tzv. digitální PCR amplifikace, se bude tento záchyt zlepšovat a tento přístup bude možno využívat i v časnějších stádiích onemocnění – např. v předoperačním vyšetřování u resektabilních pacientů.

Obecně se dá říci, že budoucnost nádorové genomiky a molekulární patologie plicních karcinomů je zřejmě v rutinním zavádění tzv. celopanelových testů, kdy je současně vyšetřeno více markerů za účelem získání komplexního klinického obrazu. V souvislosti s vývojem nových metodik se i zdá, že dojde k renesanci vyšetřování cirkulujících nádorových buněk, jako další modalit *tekuté biopsie* a jejich využití především pro následnou kultivaci a testování léčebného účinku či rezistence u jinak nepřístupných nádorů. Pro všechny přicházející nové postupy však platí, že je vždy třeba mít na paměti především klinickou využitelnost (*clinical utility*), jako zásadní aspekt přenosu výsledků výzkumu do klinické praxe. Stejně tak je stále platným faktem, že informace získaná ze zmiňovaných vyšetření především pomáhá dotvářet kompletní hodnocení patologického preparátu a nelze ji tedy chápat jako náhradu standardních histopatologických postupů.

*Podpořeno projektem institucionální podpory výzkumu MO 1012*

## LITERATURA

1. Borczuk AC, Toonkel RL, Powell CA. Genomics of lung cancer. *Proc Am Thorac Soc.* 2009; 6: 152–158.
2. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014; 511: 543–550.
3. Geurts van Kessel A. The cancer genome: from structure to function. *Cell Oncol.* 2014; 37: 155–165.
4. Liu ET. Functional genomics of cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 18: 251–256.
5. Tyner JW. Functional Genomics for Personalized Cancer Therapy. *Transl. Med.* 2014; 6: 243fs26.
6. Khoo Ch, et al. Molecular methods for somatic mutation

- testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond *Transl Lung Cancer Res.* 2015; 4: 126–141.
7. Meldrum C, et al. Next-Generation Sequencing for Cancer Diagnostics: a Practical Perspective *Clin Biochem Rev.* 2011 Nov; 32(4): 177–195.
8. Alexandrov LB. Signatures of mutational processes in human cancer, *Nature*, 2013; 500: 415–421.
9. Youn A, et al. Identifying cancer driver genes in tumor genome sequencing studies, *Bioinformatics*, 2011; 15(27): 175–181.
10. Vogelstein B, et al. Cancer genome landscapes, *Science*, 2013; 33: 1546–1558.

11. George J, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature.* 2015; 524: 47–53.
12. Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res.* 2015; 21: 4786–4800.
13. Owonikoko TK, et al. PD-L1, PD-1, and CTLA-4 as prognostic biomarkers in resected non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl; ASCO abstr 7551).
14. Bin H, Youli Z. Detecting Circulating Tumor Cells: Current Challenges and New Trends *Theranostics* 2013; 3: 377–394.

15. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, Ward TH, Backen A, Clack G, Hughes A, Ranson M, Blackhall FH, Dive C. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol.* 2012; 7: 306–315.

16. Benesova L, Belsanova B, Suchanek S, Kopeckova M, Minarikova P, Lipska L, Levy M, Visokai V, Zavoral M, Minarik M. Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Anal Biochem.* 2013; 433: 227–234.

17. Bettgowda C. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.*, 2014; 6: 224ra24.

18. Liu X, et al. The diagnostic accuracy of pleural effusion and plasma samples versus tumour tissue for detection of EGFR mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of methodologies. *J Clin Pathol.* 2013; 66: 1065–1069.