

## PRIMJENA NOVIH GENOMSKIH METODA U PEDIJATRIJSKOJ ONKOLOGIJI

IRENA DRMIĆ HOFMAN<sup>1,2</sup>

*Tijekom posljednjih deset godina, zahvaljujući brojnim poboljšanjima tehnika, tehnologija i procesa razvijenih unutar Projekta ljudskog genoma, omogućen je brzi razvoj genomike, odnosno cijelog novog područja tzv. genomske medicine. Napredak u razvoju tehnologija sekvenciranja nove generacije (engl. next-generation sequencing, NGS) za cjelogenomsko (engl. whole genome sequencing, WGS) i cjeloegzomsko (engl. whole exome sequencing, WES) sekvenciranje doveo je do vrlo značajnih promjena u ovom području te omogućio bolje razumijevanje bioloških osnova bolesti i unaprijedio mogućnosti liječenja, posebice malignih bolesti, kako u odraslih tako i u djece. U ovom članku donosi se pregled recentnih spoznaja u primjeni genomike u pedijatrijskoj onkologiji, prikaz najznačajnijih mutacija gena povezanih s najvažnijim tumorima dječje dobi (leukemije, solidni tumori i tumori mozga), te razmatra perspektiva primjene genomskih metoda u liječenju tumora dječje dobi.*

Deskriptori: GENOMIKA, SEKVENCIRANJE NOVE GENERACIJE (NGS), TUMORI DJEČJE DOBI

### KONTEKST

Tijekom posljednjih deset godina, zahvaljujući brojnim poboljšanjima tehnika, tehnologija i procesa razvijenih unutar Projekta ljudskog genoma, omogućen je brzi razvoj genomike, odnosno cijelog novog područja, tzv. genomske medicine. Razvoj tehnologija sekvenciranja nove generacije (engl. next generation sequencing, NGS) unio je pravu revoluciju, omogućio bolje razumijevanje biologije mnogih bolesti i unaprijedio mogućnosti njihovog liječenja, posebice u području onkologije i pedijatrijske onkologije (1).

Troškovi sekvenciranja DNA danas su znatno smanjeni, a trenutno dostupne tehnologije omogućavaju provedbu različitih pristupa sekvenciranju (2). Nekoliko je pristupa, koji uključuju (a) cje-

logenomsko sekvenciranje (engl. *whole genome sequencing*, WGS), koje uključuje analizu varijacija u pojedinačnom (jednom) nukleotidu i razlika u broju kopija u svim parovima baza DNA, (b) cjeloegzomsko sekvenciranje (engl. *whole exome sequencing*, WES) za analize mutacija i razlika u broju kopija prepisanih eksona koji kodiraju protein, mikro RNA, kao i ostalih vrsta RNA, (c) sekvenciranje RNA (analize ekspresije gena, promjene tijekom splicinga, stvaranje fuzijskih transkripata), te (d) detekcija epigenetičkih promjena, koje se temelje na kemijskim promjenama poput metilacije DNA i kromatina (bez promjene sekvence DNA), ali također utječu na ekspresiju gena. U idealnom bi slučaju svi navedeni pristupi trebali uključeni u analitički panel, koji bi tek tada dao cjelovit prikaz individualnog seta gena (3).

Ovakav cjelovit pristup analizi na genetičkoj i epigenetičkoj razini, ima velik potencijal za poboljšanje liječenja i samog ishoda bolesti, kao i za smanjivanje neželjenih nuspojava u terapiji najčešćih pedijatrijskih tumora (većini akutnih limfoblastičnih leukemija (ALL), limfoma, solidnih tumora niskog i intermedijarnog rizika), a što bi u konačnici

moglo dovesti i do poboljšanja ishoda liječenja djece s tumorima visokog rizika (metastatskih solidnih tumora, uznapredovalih neuroblastoma, većine tumora mozga, akutne mijeloidne leukemije i pojave relapsa bolesti).

Zahvaljujući brojnim istraživačkim skupinama i konzorcijima okupljenim u kolaborativne projekte (primjerice TARGET inicijativa i Pediatric Cancer Genome Project), primjenom najnovijih metoda sekvenciranja genoma i egzoma, identificirane su brojne genetičke promjene u najčešćim pedijatrijskim tumorima, s krajnjim ciljem primjene tih istraživanja u pronalaženju efikasnog liječenja, koje bi se temeljilo na potvrđenim molekularnim primjenama (4).

Nadalje, kao rezultat smanjivanja troškova sekvenciranja, NGS velikom brzinom ulazi u rutinsku kliničku laboratorijsku praksu, što dodatno doprinosi daljnjem gomilanju podataka o mutacijama, posebice u malignim bolestima. Kako se većina mutacija koje uzrokuju bolesti nalazi u kodirajućim dijelovima ljudskog genoma, tako je većina dobivenih podataka generirana pomoću WES-a, koje je jeftinije od cjelogenomskog sekvenciranja. Međutim, primjena

<sup>1</sup>KBC Split, Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju

<sup>2</sup>Medicinski fakultet u Splitu, Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Irena Drmić Hofman  
KBC Split, Klinički zavod za patologiju,  
sudska medicinu i citologiju  
21000 Split, Spinčićeva 1  
E-mail: irena.drmic.hofman@mefst.hr

WES-a je dijelom ograničavajuća, budući se ovim pristupom ne mogu nužno dokazati fuzijski transkripti i ne može se dobiti informacija o ekspresiji gena koja bi razjasnila aktivaciju različitih bioloških putova, a posebice signalnih putova u tumorima.

Treba dodatno napomenuti da su danas razvijeni i dostupni brojni tumorski paneli za NGS testiranja koji već imaju rutinsku primjenu za dokazivanje najčešće promjena u genskim i intronskim sekvencama karakterističnim za tumore u odraslih, a nešto su rjeđe u primjeni za analize pedijatrijskih tumora. Razlozi tomu nalaze se u činjenici da dobiveni rezultati sekvenciranja, uz poneke izuzetke, pokazuju da tumori dječje dobi sadrže znatno manje mutacija negoli tumori u odraslih, dok unutar pojedinih tipova tumora većina mutacija nije zajednička većem broju bolesnika (5, 6).

U ovom članku, dat ćemo prikaz genskih mutacija povezanih s najčešćim tumorima dječje dobi, kao što su hematološke maligne bolesti, solidni tumori i tumori mozga te razmotriti značenje primjene genomskih metoda u pedijatrijskoj onkologiji.

#### Genetički profili najčešćih pedijatrijskih tumora

Hematološke maligne bolesti predstavljaju približno 40% svih pedijatrijskih malignih bolesti. Zahvaljujući razvoju brojnih lijekova, ponajprije inhibitorima tirozin kinaza (TKI), koji djeluju na ciljane molekularne defekte, ishodi liječenja većine dječjih leukemija i limfoma znatno su poboljšani. Translokacija BCR-ABL1 ima dijagnostičko i prognostičko značenje, a molekularno dokazivanje ove translokacije može predvidjeti uspješnost liječenja s TKI u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji i u B-limfoblastičnoj leukemiji (7). Zanimljivo, 70% bolesnika s ALL koji su pozitivni na BCR-ABL1 imaju i deleciju gena za limfoidni transkripcijski faktor Ikaros, IKZF1, povezanu s nepovoljnim prognostičkim ishodom (8). Studije genoma i ekspresije gena potvrdile su povezanost mutacija u genima NOTCH1 (koji kodira jedan od receptora iz skupine NOTCH) i FBXW7 (F-box protein) s T-staničnim tipom ALL (9).

Solidni tumori dječje dobi relativno su česti i obuhvaćaju neuroblastom, Ewingov sarkom, rabdomiosarkom i osteosarkom. Najčešće genetičke promjene, kako u obiteljskim tako i sporadičnim slučajevima neuroblastoma, jesu somatske mutacije u genu za ALK kinazu, koje predstavljaju metu za ciljnu terapiju inhibitorima ALK-a. Osim ALK mutacija koje su potvrđene u 9,2% slučajeva, u oko 9% testiranih bolesnika s neuroblastomima su pronađene delecije u genu ATRX, a mutacije u genu PTPN11, koji kodira protein tirozin fosfatazu, u svega 2,9% bolesnika (10, 11). Iako je amplifikacija onkogeno MYCN česta u neuroblastomima i potvrđena je u oko 25% slučajeva, do sada nije pronađena uspješna terapija koja bi ciljano djelovala na ovu molekularnu promjenu. No, nekoliko kliničkih pokusa koji su u tijeku, pokazali su ohrabrujuće naznake za moguću primjenu inhibitora BET bromodomene i inhibitora CDK7 u slučajevima dokazane prekomjerne ekspresije MYC gena (12).

Ewingov sarkom karakteriziraju translokacije između gena EWSR1 na kromosomu 22 (q11.2) i članova obitelji gena ETS; obično FLI1 (11q12). Više od 90% Ewingovih sarkoma ima fuziju EWSR1. Unatoč relativno velikoj učestalosti mutacije, recentni podaci dobiveni sekvenciranjem pokazali su da postoje brojne kodirajuće varijante u tumoru (prosječno njih 10), uz mali broj zajedničkih varijanti, što je u skladu s nalazima u još nekim pedijatrijskim tumorima (13, 14). Znatno konzistentnije promjene u Ewingovom sarkomu su mutacije u genima STAG2, zabilježene su u 17% slučajeva, potom delecije u genu CDKN2A (12%) i mutacije TP53 (7%), dok su mutacije u genima EZH2, BCOR i ZMYM3 pronađene u 2,7% slučajeva. Mutacije STAG2 i TP53 četo se pojavljuju zajedno i predstavljaju nepovoljan prognostički čimbenik (15).

Na isti način nepovoljno djeluju i fuzije gena između PAX3 ili PAX7 i FOXO1 u alveolarnom podtipu rabdomiosarkoma (16). Zanimljivo, sekvenciranje je potvrdilo kako ovi tumori imaju manje nesinonimnih mutacija u usporedbi s embrionalnim tipom tumora u kojih se ne stvaraju fuzijski geni i koji imaju bolju prognozu (17, 18).

Zahvaljujući primjeni genomskih metoda, velik iskorak je napravljen i u liječenju pedijatrijskih tumora mozga, no te spoznaje još uvijek više doprinose postavljanju dijagnoze i razvrstavanju određenih tumora u različite skupine, negoli prognozi i terapiji. Svakako najvažnije otkriće posljednjih godina bilo je povezivanje mutacija u genu ACVR1 s difuznim gliomima (19, 20). Gen ACVR1 kodira receptor za koštani morfogenetski protein tipa 1, koji se aktivira preko Rb i p21 i tako dovodi do progresije tumora, što otvara novo poglavlje u genotipu ovih tumora. U gliomima niskog gradusa opisane su promjene u genu BRAF, kao što su fuzijski prijepis KIAA1549-BRAF i mutacija V600E, čime su odškrinuta vrata razvoju potencijalne terapije (21). Sekvenciranjem genoma dobiveni su podaci koji omogućavaju razvrstavanje meduloblastoma u četiri zasebne genomske skupine (22). Osim mutacija u TP53, većina je otkrivenih mutacija potpuno nova i povezana s epigenetičkim promjenama DNA i remodeliranjem kromatina (23).

#### ZAKLJUČAK

Uzevši u obzir sve podatke dobivene analizom genoma, egzoma i epigenoma pedijatrijskih tumora, posebice tumora mozga, može se zaključiti kako će saznanja o specifičnim genetičkim promjenama dodatno doprinijeti stvaranju temelja za precizniju klasifikaciju tumora, a za nadati je se kako će ti podaci napraviti dodatni pomak prema uspješnijem liječenju tumora dječje dobi.

#### NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

#### ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

#### SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na [www.icmje.org/doi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/doi_disclosure.pdf) (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./ *All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/doi\_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial rela-*

*tionships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

#### LITERATURA

- Huether R, Dong L, Chen X et al. The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nat Commun* 2014; 5: 3630.
- Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 1023-31.
- Green RC, Berg JS, Grody WW et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med* 2013; 5: 565-74.
- Downing JR, Wilson RK, Zhang J et al. The Pediatric Cancer Genome Project. *Nat Genet* 2012; 44: 619-22.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE et al. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339: 1546-58.
- Zhang J, Wu G, Miller CP et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet* 2013; 45: 602-12.
- Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 2012; 120: 1165-74.
- van der Veer A, Waanders E, Pieters R et al. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood* 2013; 122: 2622-9.
- Meijerink JP. Genetic rearrangements in relation to immunophenotype and outcome in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23: 307-18.
- Schleiermacher G, Javanmardi N, Bernard V et al. Emergence of new ALK mutations at relapse of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2014; 32: 2727-34.
- Weller M, Pfister SM, Wick W et al. Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. *Lancet Oncol* 2013; 14: 370-9.
- Parsons DW, Roy A, Monzon FA et al. What's in an exome? Diversity of diagnostic and incidental findings revealed by clinical tumor and germline sequencing of 100 children with solid tumors. *J Clin Oncol* (abstract 10012). 2014; 32: 5.
- Brohl AS, Solomon DA, Chang W et al. The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLoS Genet*. 2014; 10: 1004475.
- Tirode F, Surdez D, Ma X et al. Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov*. 2014; 4: 1342-53.
- Crompton BD, Stewart C, Taylor-Weiner A et al. The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov* 2014; 4: 1326-41.
- Shern JF, Chen L, Chmielecki J et al. Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer Discov* 2014; 4: 216-31.
- Janeway KA, DuBois SG, Glade Bender JL et al. Multicenter study assessing tumor molecular profiles in advanced pediatric solid tumors. *J Clin Oncol* (abstract 10011). 2014; 32: 5.
- Lee RS, Stewart C, Carter SL et al. A remarkably simple genome underlies highly malignant pediatric rhabdoid cancers. *J Clin Invest* 2012; 122: 2983-8.
- Buczkwicz P, Hoeman C, Rakopoulos P et al. Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat Genet* 2014; 46: 451-6.
- Wu G, Diaz AK, Paugh BS et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric nonbrainstem high-grade glioma. *Nat Genet* 2014; 46: 444-50.
- Berghoff AS, Preusser M. BRAF alterations in brain tumours: molecular pathology and therapeutic opportunities. *Curr Opin Neurol* 2014; 27: 689-96.
- Zhukova N, Ramaswamy V, Remke M et al. Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. *J Clin Oncol* 2013; 31: 2927-35.
- Robinson G, Parker M, Kranenburg TA et al. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature* 2012; 488: 43-8.

#### Summary

##### APPLICATION OF NOVEL GENOMIC METHODS IN PAEDIATRIC ONCOLOGY

I. Drmić Hofman

*In the last decade, recent advantages in the techniques, technologies and processes developed within the Human Genome Project, enabled rapid development of a whole new field, so called genomic medicine. Technical breakthroughs and advances in gene sequencing methodologies (next-generation sequencing, NGS), applied for whole genome (WGS) and whole exome sequencing (WES) have brought about revolutionary changes in the field, contributed to a better understanding of the biological basis of many diseases and lead to therapeutic improvement in adult and pediatric cancer treatment. The present review describes recent advances in application of genomics in pediatric oncology, major genomic alterations found in most common paediatric cancers (leukemia, solid tumors and paediatric brain tumors) and its application in the treatment of childhood tumors.*

Descriptors: GENOMICS, NEXT-GENERATION SEQUENCING, CHILDHOOD TUMORS

Primljeno/Received: 23. 3. 2016.

Prihvaćeno/Accepted: 4. 4. 2016.