



MECHANIZMY CHOROBY

Znaczenie klonalnej ewolucji genomu dla medycyny nowotworów

Samuel Aparicio, BM, BCh, PhD, Carlos Caldas, MD

N Engl J Med 2013;368:842-851.

Dr Aparicio,
Department of Molecular Oncology,
British Columbia Cancer Research
Centre i Department of Pathology
and Laboratory Medicine,
University of British Columbia
– oba ośrodki w Vancouver,
Kanada.

Dr Caldas,
Department of Oncology,
University of Cambridge i Cancer
Research UK Cambridge Institute,
Li Ka Shing Centre, Cambridge
Breast Unit, Addenbrooke's
Hospital, Cambridge University
Hospital National Health Service
Foundation Trust i National Institute
for Health Research Cambridge
Biomedical Research Centre oraz
Cambridge Experimental Cancer
Medicine Centre
– wszystkie ośrodki w Cambridge,
Wielka Brytania.

Adres do korespondencji:
dr Samuel Aparicio,
Department of Molecular Oncology,
British Columbia Cancer Research
Centre, 675 W. 10th Ave.,
Vancouver, BC V5Z 1L3 Canada,
e-mail:
saparicio@bccrc.ca.

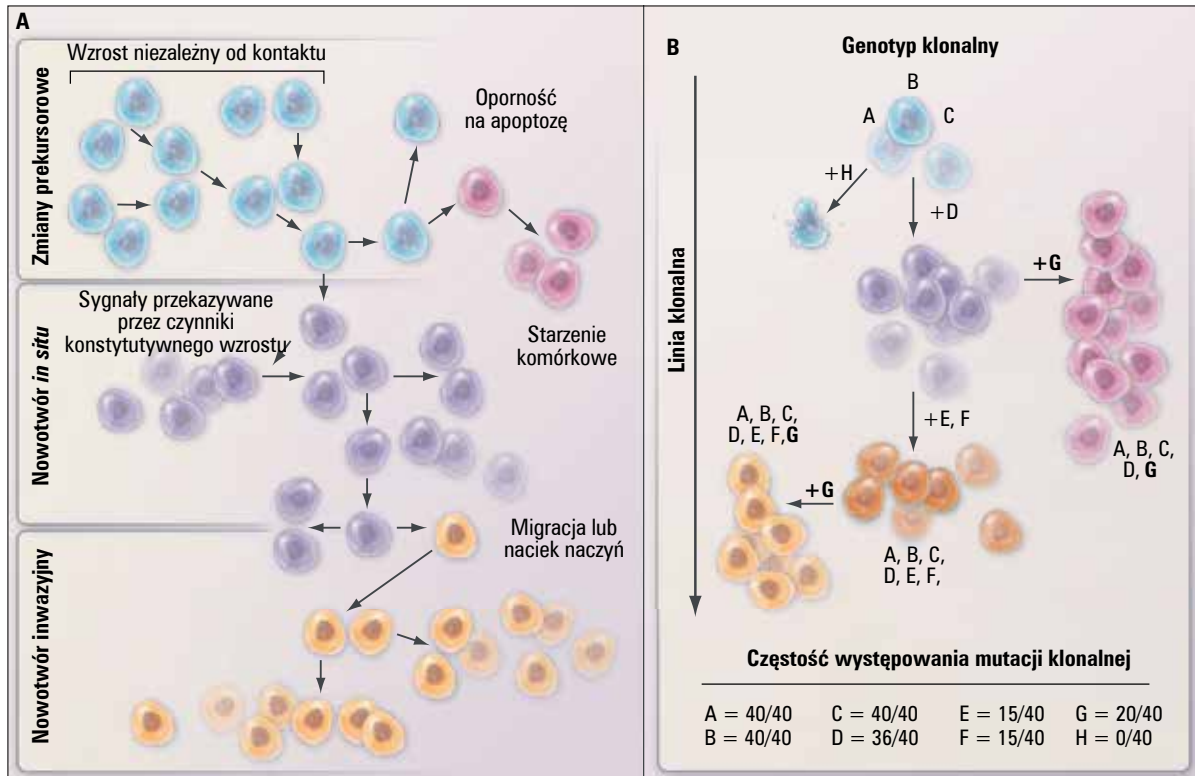
W ciągu najbliższych pięciu lat badania prowadzone na całym świecie mogą się przyczynić do scharakteryzowania występowania klonalnie dominujących mutacji somatycznych (tych, które znajdują się w większości komórek nowotworu) w ponad 21 000 nowotworów różnego typu.¹ Zmniejszenie kosztów prowadzenia badań oraz udoskonalenia technologiczne ułatwiły upowszechnienie sekwencjonowania materiału genetycznego chorych na nowotwory. Wstępne wyniki wskazują na możliwość scharakteryzowania genomu nowotworu w czasie odpowiednio krótkim, by wykorzystać wyniki tej analizy w leczeniu chorych.^{2,3} Genomika nowotworu stała się tematem kilku opublikowanych ostatnio opracowań przeglądowych,⁴⁻⁷ w których jednak nie skupiano się na konsekwencjach faktu, że nowotwory zbudowane są z klonów komórkowych i jakie ewentualne korzyści mogą się z tym wiązać. Uświadomienie sobie, że większość nowotworów to ekosystemy złożone z klonów ulegających ewolucji, wpływa na postępowanie w praktyce klinicznej. Poniżej omówiono to zagadnienie, zwracając przy tym szczególną uwagę na nowotwory nabłonkowe.

EWOLUCJA TYPU DARWINOWSKIEGO A NOWOTWÓR

Teoria ewolucji Darwina została opracowana w celu wyjaśnienia procesu powstawania gatunków. Udowodniono, że jest ona zasadniczą cechą układów biologicznych, w tym nowotworów ludzkich. Choć koncepcja ewolucji leżała u podstaw biologii nowotworów od dziesięcioleci, pojawienie się nowych metod sekwencjonowania, pozwalających na sekwencjonowanie całych genomów nowotworów, pozwoliło spojrzeć na to zagadnienie w nowym świetle.

We wczesnych latach 50. minionego stulecia teoria chromosomalna nowotworu zasugerowała istnienie tzw. komórek pnia o pokrewnych cechach chromosomalnych.^{8,9} Koncepcję struktury klonalnej i ewolucji nowotworów elegancko zsyntetyzował Peter Nowell w 1976 r., zbierając wiele wcześniejszych spostrzeżeń dotyczących heterogenności chromosomalnej występującej podczas ewolucji nowotworu. Zasadniczym elementem tej idei jest założenie istnienia klonu, czyli grupy pokrewnionych ze sobą komórek wywodzących się od wspólnego przodka (ryc. 1). Klonalne zależności między komórkami powstają na skutek selekcji zachodzącej na poziomie pojedynczych dzielących się komórek, mających większą lub mniejszą szansę przeżycia (ryc. 1A). Selekcja zachodzi na poziomie fenotypów, które mogą być stabilne lub przemijające. Fenotypy stabilne powstają na ogół w następstwie utrwalonych mutacji, z których najbardziej oczywiste są mutacje onkogenne¹¹ oraz mutacje wpływające na wrażliwość komórek na leki.

RYCINA 1



Ewolucja klonalna i związki klonalne.

Część A. Selekcja operuje na fenotypach określanych mianem „znaków szczególnych” nowotworów, prowadząc do powstania klonów komórek o różnych cechach. Nie wszystkie cechy powodują ekspansję – np. przyspieszenie starzenia się komórek może prowadzić do zahamowania rozwoju klonu lub jego utraty. Nabywanie mutacji somatycznych i zmian w epigenomie (oznaczone strzałkami) może być fenotypowo neutralne lub powoduje powstanie nowych fenotypów (komórki oznaczone różnymi kolorami). Część B. Postępujące nagromadzenie mutacji lub innych właściwości dziedzicznych decyduje o powstawaniu związków klonalnych. Literami oznakowano mutację lub cechę dziedziczną. Kolorami oznaczono odrębne grupy komórek o wspólnym pochodzeniu (klony). Możliwe są różne zależności – np. mutacja G współistnieje niezależnie i prowadzi do utworzenia się dwóch różnych genotypów klonalnych zawierających G. Obecność mutacji niekoniecznie wskazuje na wystąpienie selekcji, przedstawione drzewko zależności mogło powstać w wyniku losowego dryftu genetycznego. W schematach pominięto komórki prawidłowe i wspierające.

Swoiste dla danego nowotworu klonalne związki typu epigenetycznego będą prawdopodobnie w przyszłości coraz częściej dostrzegane. Związki klonalne mogą być też skutkiem mutacji pojawiających się w miarę upływu czasu (tzw. dryft genetyczny) bez selekcji (ryc. 1B). Różnice genomowe są wówczas prawdopodobnie neutralne lub bierne w stosunku do fenotypu. Neutralne genetycznie oznakowanie komórek wykorzystuje się w badaniach doświadczalnych od dziesięcioleci do śledzenia wybranych linii komórek w rozwoju. Selekcja może też zachodzić w fenotypach przejściowych lub niestabilnych,^{13,14} a wówczas zależności między komórkami o określonym pochodzeniu w genomie lub epigenomie nie są tak wyraźne.

Pogląd zakładający klonalność genomową nowotworu jest poparty wieloma obserwacjami dotyczącymi nowotworów nabłonkowych lub wywodzących się z układu krwiotwórczego, świadczących, że nowotwory są zbudowane z klonów, a ewolucja klonalna ludzkich nowotworów jest w istocie przyczyną stopniowego nabierania typowych cech nowotworowych.¹⁵ Idea, że nowotwory człowieka składają się z ewoluujących klonów komórkowych, pozwala przewidzieć pewne ich cechy, takie jak występowanie genotypów klonalnych (tzn. nie wszystkie mutacje występują w tej samej komórce), ekspansja lub zanik populacji klonalnych w miarę upływu czasu, występowanie różnych odmian klonalnych w obrębie ogniska nowotworu, częściowa odpowiedź no-

Słowniczek

Zaburzenie liczby kopii: zwiększenie lub zmniejszenie liczby kopii fragmentów DNA wielkości od kilkudziesięciu do kilkuset par zasad (w komórce prawidłowo występują dwie kopie).

Epigenetyczny: odnoszący się do dziedzicznych fenotypów lub modyfikacji niezwiązanych z sekwencją DNA, np. metylacja DNA, metylacja histonów.

Mutacja (prowadząca do) utraty funkcji: mutacja hamująca lub eliminująca czynność białka kodowanego przez gen, w którym ta mutacja występuje.

Porównawcza hybrydyzacja genomów oparta na mikromacierzach: metoda wykrywania zaburzeń w liczbie kopii fragmentów sekwencji DNA.

Sekwencjonowanie nowej generacji (sekwencjonowanie drugiej generacji): metody oparte na analizie sekwencji DNA na podstawie pojedynczych cząsteczek DNA i równoległego sekwencjonowania setek milionów fragmentów DNA równocześnie na pojedynczej platformie (masowe sekwencjonowanie równoległe).

wotworu na leczenie, pojawianie się przerzutujących komórek nowotworowych opornych na leczenie, rozróżnienie komórek przerzutujących z podklonów (w populacji wyjściowej zjawisko to może zachodzić z różną częstością), pozabawienie niektórych nowotworów struktury klonalnej wykrywanej na poziomie aberracji chromosomalnych oraz występowanie neutralnych związków klonalnych (np. powstałych z losowego dryftu genetycznego) bez wyraźnych następstw fenotypowych.

ROZSZYFROWANIE EWOLUCJI KLONALNEJ

Utrwalone mutacje somatyczne mogą służyć określeniu związków między komórkami, wynikających z ich pochodzenia. W badaniach nad klonalną strukturą nowotworów od dziesięcioleci wykorzystuje się duże aberracje chromosomalne. Do niedawna możliwość systemowego określania mutacji pojedynczych nukleotydów w obrębie nowotworów była ograniczona. Pojawienie się nowej generacji urządzeń do sekwencjonowania (patrz słowniczek) znacząco zmniejszyło koszt metody i poszerzyło skalę sekwencjonowania genomu. Większość urządzeń do sekwencjonowania pozwala też na określenie częstości allelicznej niemal wszystkich zaburzeń wykrywanych w genomie (ryc. 2).

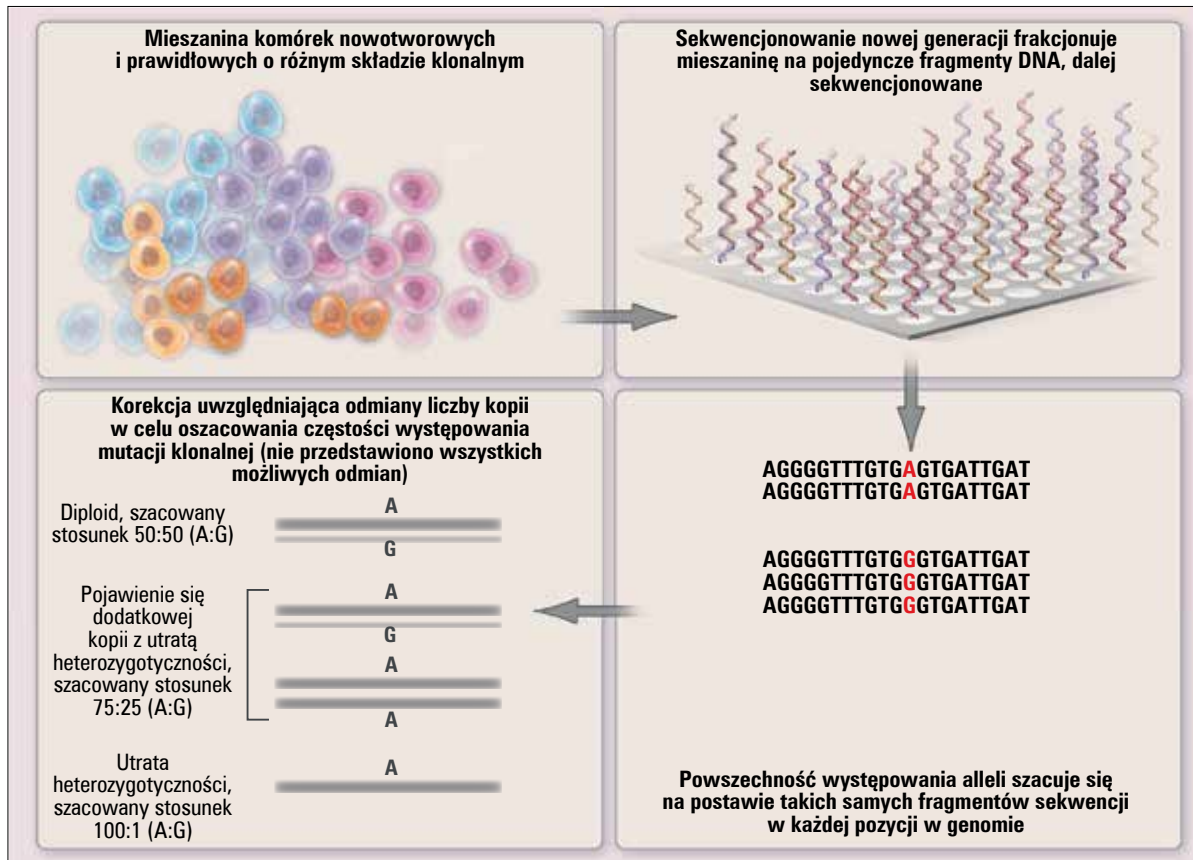
W mieszanej populacji klonów nowotworowych trzy kluczowe koncepcje odnoszą utrwalone zaburzenia mierzone w populacji całkowitej (częstość występowania alleli) do zaburzeń występujących w klonach komórek tworzących nowotwór (ryc. 1B). Po pierwsze, częstość występowania mutacji klonalnych jest złożoną miarą częstości występowania danej mutacji w populacji i stanowi funkcję rozmiaru każdej populacji klonalnej zawierającej taką mutację. Po drugie, genotyp klonalny

odnosi się do zestawu utrwalonych mutacji klonalnych definiujących dany klon. Po trzecie, linia klonalna określa związki między klonami występujące w miarę ich ewolucji w czasie. Związki klonalne przedstawia się na ogół jako rozgałęzione struktury przypominające drzewa. Może jednak występować wiele topologii o złożonym charakterze,^{20,21} dochodzi w nich bowiem do wymierania całych gałęzi, niezależnego od siebie powstawania mutacji drugorzędowych (w tym identycznych) oraz mutacji występujących w genomie na różną skalę (od zaburzeń chromosomalnych po pojedyncze zmiany nukleotydowe).

Częstość występowania mutacji klonalnych składa się na leżącą u podłoża choroby nowotworowej złożoność klonalną guza (ryc. 1B i 2), nie pozwala jednak na bezpośrednie przewidywanie klonalnych genotypów. Określenie takich genotypów wymaga użycia metod operujących na poziomie pojedynczych komórek,^{22,23} których zastosowanie nadal jest dalekie od rutynowego. Oznaczenie rozpowszechnienia występowania mutacji klonalnych na poziomie pojedynczego nukleotydu pozwala jednak na ukazanie przebiegu ewolucji w czasie i przestrzeni (ryc. 3), po uwzględnieniu zaburzeń w liczbie chromosomów. W pierwszym z badań oceniających powszechność występowania alleli na podstawie wyników sekwencjonowania całego genomu, w którym wykazano ewolucję klonalną, porównano materiał pochodzący z przerzutu raka zrazikowego piersi z materiałem pochodzącym z ogniska pierwotnego raka, pobranym od tej samej chorej 9 lat wcześniej.²⁴ W tej parze próbek oznaczenia częstości występowania alleli w regionach diploidalnych bądź takich, w których liczba kopii nie uległa zmianie, wykazały ewolucję zmiennej liczby subdominujących mutacji somatycznych w komórkach pierwotnego ogniska nowotworu, które stały się mutacjami dominującymi w populacji komórek nowotworowych. Posługując się zbliżoną metodologią, analizowano zmianę częstości występowania alleli somatycznych w obcogatunkowych przeszczepach ludzkiego raka piersi.²⁵ Stwierdzono, że selekcja zachodząca w trakcie przeszczepiania przyczynia się do uzyskania składu klonalnego zbliżonego bardziej do obrazu obserwowanego w przerzucie niż w pierwotnym ognisku nowotworu tej samej chorej.

Ważnym następstwem klonalnej natury nowotworów jest przestrzenne i czasowe zróżnicowanie składu guzów pierwotnych. Obserwowano je ostatnio w wielu nowotworach nabłonkowych dzięki zastosowaniu metod sekwencjonowania nowej generacji. Na przykład zsekwencjonowanie genomów raków nerek²⁶ ujawniło znaczne zróżnicowanie przestrzenne składu klonalnego w obrębie pojedynczego ogniska nowotworu, co oznacza, że diagnostyka oparta na analizie materiału pobranego z jednego tylko regionu guza jest

RYCINA 2



Oznaczanie częstości występowania allelu za pomocą sekwencjonowania nowej generacji i analiza klonalna.

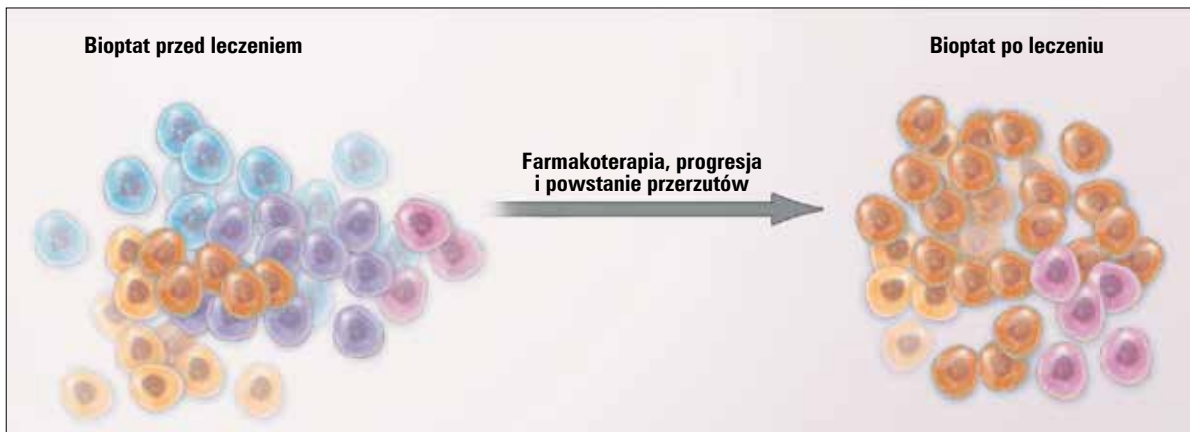
Mieszaninę klonów komórek nowotworowych i komórek prawidłowych (część lewa ryciny u góry) można analizować metodami sekwencjonowania nowej generacji (część prawa ryciny u góry). Proces tworzenia biblioteki i sekwencjonowanie prowadzą do uzyskania sekwencji pojedynczych cząsteczek DNA sekwencjonowanych w tym samym czasie. Oznacza to, że liczne sekwencje można policzyć bezpośrednio i określić częstość występowania alleli w populacji komórek po zestawieniu sekwencji (część prawa ryciny na dole) z referencyjną sekwencją genomową. Korekta uwzględniająca wpływ odmian liczby kopii chromosomalnych oraz odmian liczby kopii segmentów pozwala na oszacowanie rzeczywistego rozpowszechnienia klonalnego każdego nukleotydu w populacji komórek (część lewa ryciny na dole).

obarczona dużą nieściślnością. Znaczna heterogenność przestrzenna cechuje też nowotwory piersi,^{27,28} gruczołu krokowego^{29,30} i trzustki.^{31,32} Autorzy jednego z badań wykazali, jak bardzo odmienne kłony przerzutowe powstają z różnych regionów pierwotnego raka trzustki, przedstawili też postępującą ewolucję klonalną w takich przerzutach. Wyjątkowo silne zróżnicowanie stopnia ewolucji klonalnej pierwotnych nowotworów piersi wykazano ostatnio w potrójnie receptorowo ujemnych rakach piersi³³ oraz w rakach z ekspresją receptorów estrogenowych.³⁴ W pierwszym z tych badań za pomocą metod służących oznaczaniu częstości występowania mutacji klonalnych wykazano, że potrójnie receptorowo ujemne raki piersi, uznawane za podobne

na podstawie oceny powszechnymi obecnie metodami diagnostycznymi, w chwili ustalenia rozpoznania znajdowały się w rzeczywistości na bardzo różnych etapach ewolucji genomowej i klonalnej.

W najnowszych badaniach często obserwuje się subdominujące mutacje w znanych genach supresorowych i onkogenach.^{33,35,36} Kluczowe znaczenie będzie miało określenie, które kłony danego nowotworu odgrywają najważniejszą rolę biologiczną w rozwoju choroby, np. które genotypy stwarzają ryzyko progresji nowotworu lub jego oporności na leki. Zastosowanie analizy sekwencji genomu pozwoliło wykazać, że niewielkie subklony pierwotnego ogniska nowotworu stopniowo stają się klonami śmiertelnie opornymi na leczenie

RYCINA 3



Następujące z czasem zmiany w składzie klonalnym oszacowane na podstawie zmian w częstości występowania mutacji klonalnych.

Klony komórkowe o wspólnym genotypie oznaczono tym samym kolorem. Zmiany w częstości występowania genotypów oszacowano za pomocą sekwencjonowania, po uwzględnieniu czasu i umiejscowienia. Duże zmiany w częstości występowania swoistych klonów mogą wskazać genotypy odpowiadające za oporność oraz genotypy odpowiadające za wystąpienie odpowiedzi na wybraną metodę leczenia. Wymaga to oszacowania stopnia klonalnej ekspansji/zaniku w warunkach nieselekcyjnych albo wiarygodnego założenia, że będzie ona zbliżona dla różnych klonów.

farmakologiczne.^{29,36-40} Poszukiwanie w pierwotnych ogniskach nowotworów klonów niosących cechy decydujące o zdolności do progresji lub tworzenia przerzutów jest w obecnych projektach badań ograniczone, przewidują one bowiem wykonywanie biopsji jedynie wybranych regionów tkanki nowotworu.

Klonalne zależności można dostrzec w odniesieniu do dowolnego dziedzicznego markera w genomie.¹² Przeprowadzone niedawno badania pojedynczych komórek raków piersi, oceniające zaburzenia liczby kopii, wykazały rozległą strukturę klonalną.^{27,28} Wykryto, że podobne zależności na poziomie subchromosomalnym mogą występować w rakach trzustki i nerek. Nie wszystkie nowotwory od początku cechuje złożoność klonalna. W niedawnych analizach sekwencji pojedynczych komórek – w próbkach pobranych z raka nerki⁴¹ lub z nowotworu mieloproliferacyjnego⁴² – stwierdzono brak zasadniczego zróżnicowania klonalnego w zakresie średnich i dużych częstości w populacji, obserwowano natomiast znaczne różnice w rzadko występujących mutacjach rozproszonych w genomie. Większość komórek nowotworowych wywodziła się zatem z jednego genotypu klonalnego, a dodatkowe mutacje powstawały w nielicznych komórkach umiejscowionych w różnych regionach genomu. Ustalenie, czy jest to typowy obraz struktury klonalnej w tym nowotworze, wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

NASTĘPSTWA DLA PRAKTYKI ONKOLOGICZNEJ

Stratyfikacja genomowa

W trakcie wielu obserwacji klinicznych różnych typów nowotworów (np. raka jelita grubego,^{43,44} raka piersi⁴⁵ i raka szyjki macicy⁴⁶) stwierdzono odmienność odpowiedzi na leczenie różnych ognisk przerzutowych, a nawet różnych obszarów tego samego ogniska nowotworu. Można ją częściowo tłumaczyć pojawianiem się odmiennych genomowo klonów komórek nowotworowych. Dotychczas stratyfikację genomową nowotworów^{47,48} opierano na wynikach ogólnej analizy profilu guza, która odzwierciedlała jedynie mutacje występujące w większości jego komórek. Tymczasem w praktyce klinicznej mogą być ważne również cechy mniejszych subklonów. Wykazano to w raku jelita grubego, w którym wykrycie mutacji genu *KRAS*, występującej w mniejszych subklonach komórek, pozwala wskazać chorych opornych na leczenie przeciwciałami przeciw receptorowi nabłonkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor, EGFR).⁴⁹ Co więcej, różnorodność mutacji genów *KRAS*, *BRAF* i *PIK3CA* w obrębie ogniska nowotworu zauważono w co najmniej 1-8% raków jelita grubego.⁴⁴ Sugeruje to, że nawet wśród wczesnych mutacji tzw. sterujących, podklonalność występuje wystarczająco często, by uzasadniać konieczność przeprowadzenia sta-

rannej oceny. W pewnych przypadkach będzie wskazane pobranie licznych wycinków z pierwotnego ogniska nowotworu, co będzie się wiązało z koniecznością zweryfikowania metody oceny patomorfologicznej materiału uzyskanego podczas operacji lub pobranego drogą biopsji poprzedzającej rozpoczęcie leczenia. Trzeba ustalić przydatność czynnościowych technik obrazowania nowotworu i innych metod w trakcie pobierania takich próbek do badania, można jednak przypuszczać, że rozbieżne wyniki czynnościowych badań obrazowych są prawdopodobnie skutkiem właśnie odmienności klonalnych.

Heterogenność klonalna tworzy tzw. fenotyp molekularny. Na przykład charakterystykę raków piersi określono na podstawie ich profilu uwzględniającego liczbę kopii, wykorzystując opartą na mikromacierzach porównawczą hybrydyzację genomu. Na tej podstawie wyróżniono raki monogenomiczne (zawierające klon dominujący, bez cech heterogenności) i poligenomiczne (zbudowane z wielu klonów).^{27,28} Takie wzorce heterogenności genomowej mogą mieć znaczenie rokownicze.⁵⁰

Innym ważnym zagadnieniem jest stratyfikacja leczenia ukierunkowanego u chorych z przerzutami. Obecnie opiera się ona głównie na wynikach analizy archiwalnego materiału pochodzącego z pierwotnego ogniska nowotworu. Udowodniono odmienność mutacji występujących w ognisku pierwotnym w porównaniu z występującymi w przerzutach, np. mutacji w genach *KRAS*, *BRAF* i *PIK3CA* w raku jelita grubego⁴⁴ oraz mutacji zachodzących w innych genach w rakach piersi,^{24,51} trzustki^{31,32} i nerek,²⁶ a także w rdzeniakach.³⁹ Przykłady te wskazują, że charakterystyka i ocena heterogenności klonalnej stanowią klucz do zrozumienia biologii przerzutów o różnym położeniu oraz ewolucji różnych klonów pod selekcyjną presją leczenia (omówienie w dalszej części artykułu). Podkreślają też konieczność wykonania ponownej biopsji u chorych z przerzutami. Wprowadzenie metod sekwencjonowania, analizy klonalnej występującego w krążeniu wolnego DNA komórek nowotworowych oraz materiału uzyskanego z biopsji cienkoigłowej może to ułatwić w praktyce.

Monitorowanie nowotworu

Jak zmniejszyć inwazyjność monitorowania ewolucji klonalnej? Mutacje występujące w każdym z klonów wewnątrz guza składają się na kod kreskowy identyfikujący dany klon. Gdy komórki klonu obumierają *in situ* lub wnikają do krążenia w procesie tzw. kaskady rozsięcia, zawarty w nich DNA może zostać uwolniony do krążenia. Wykrycie i sekwencjonowanie występującego w krążeniu DNA nowotworu może pozwolić na ocenę dynamiki jego przebiegu (ryc. 4).

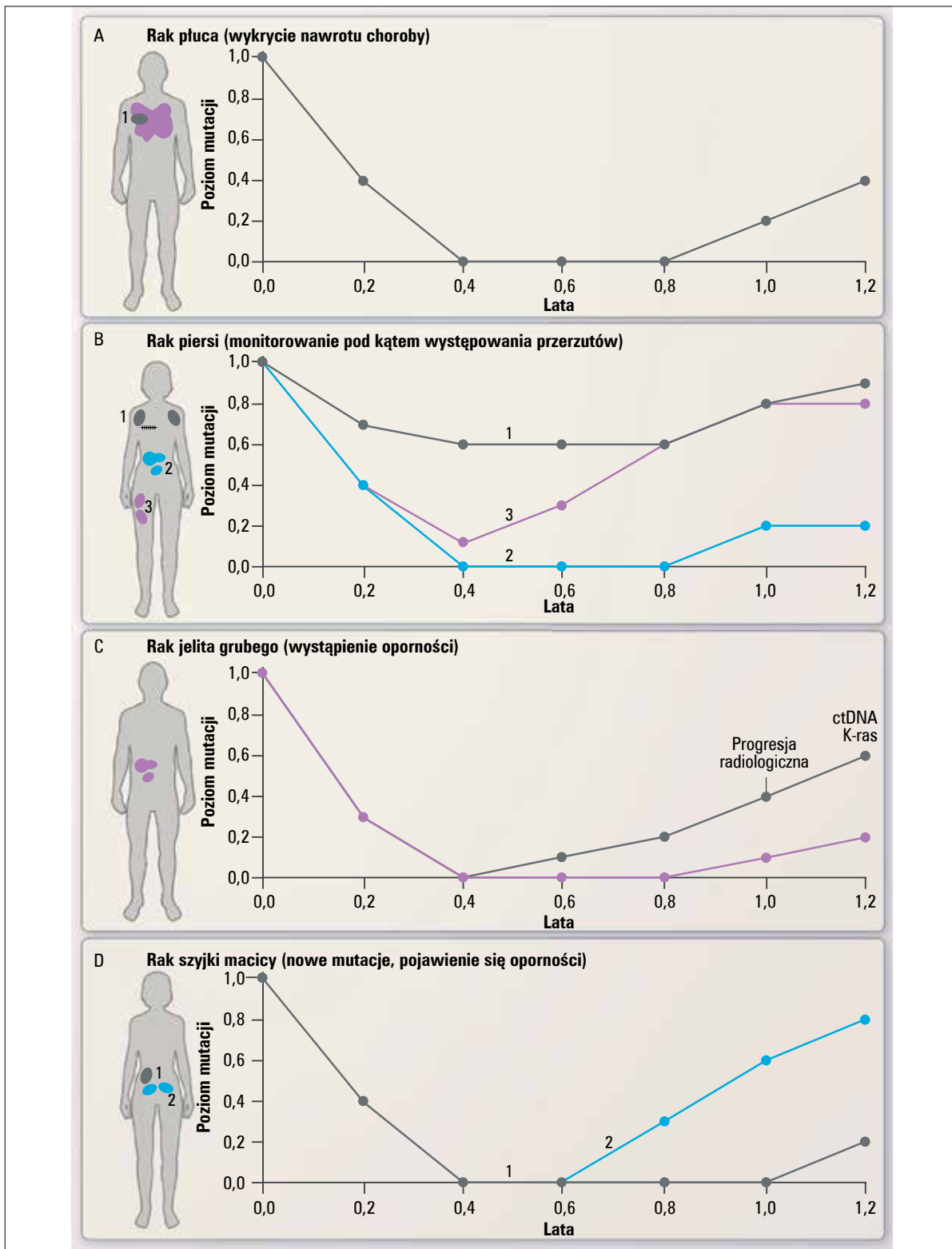
Takie postępowanie zastosowano już u chorych z przerzutami raka okrężnicy, raka piersi oraz kostniakomięsaka.⁵²⁻⁵⁴ We wszystkich tych przypadkach wykrycie i oznaczenie krążącego zmutowanego DNA wymagało wcześniejszego rozpoznania i określenia mutacji na podstawie sekwencjonowania materiału pobranego z ogniska nowotworu. Podobne działania są powszechnie wykorzystywane u chorych na białaczkę (np. testy wykrywające translokację w genie *BCR-ABL* w przewlekłej białaczce szpikowej) w celu śledzenia zasięgu nowotworu po rozpoczęciu leczenia lub rozpoznawania śladowych cech przetrwałego nowotworu.⁵⁵

Jeszcze bardziej ekscytująca jest możliwość wykorzystania bezpośredniego sekwencjonowania DNA osocza do wykrywania mutacji w DNA komórek nowotworowych obecnych w krążeniu (circulating tumor DNA, ctDNA), dzięki czemu próbkę krwi można uznać za tzw. płynny bioptat.⁵⁶ Takie postępowanie można wykorzystać np. u chorych z licznymi lub niedostępnymi przerzutami w celu scharakteryzowania mutacji niektórych lub wszystkich ognisk przerzutowych. Przykładem jest gen *PIK3CA*, którego mutacje wykryto w osoczu 28-29% chorych na raka piersi z przerzutami. Występowanie mutacji tego genu w krążącym DNA korelowało ze stanem jego mutacji w próbce pobranej w tym samym czasie z ogniska przerzutu.⁵⁷ Rozwój metod genotypowania ctDNA w płynnych bioptatach będzie zależał od wykazania, że mutacje są wystarczająco czułe i swoiste, by wykorzystać je do monitorowania zasięgu nowotworu.

Seryjne sekwencjonowanie DNA z osocza można także wykorzystać do monitorowania dynamiki różnych klonów w celu śledzenia ich rozwoju. Niedawno potwierdzono to w badaniu, w którym sekwencjonowanie DNA pozwoliło na monitorowanie 10 współistniejących mutacji występujących u chorej na raka piersi. Dynamiczna zmiana w ctDNA niosącym indywidualną mutację różniła się w zależności od sekwencji podania dwóch różnych schematów chemioterapeutycznych, co sugeruje zróżnicowaną odpowiedź różnych subklonów na chemioterapię.⁵⁶

Przydatność wykrywania i oceny DNA będzie zależała od wiarygodności, z jaką ctDNA odzwierciedla ewolucję nowotworu. Autorzy dwóch opublikowanych niedawno doniesień opisali wykrywanie zmutowanych alleli genu *KRAS* we krwi chorych na raka jelita grubego z przerzutami leczonych przeciwciiałem o działaniu ukierunkowanym przeciw EGFR. Allele te wykryto już na 10 miesięcy (średnio 21 tygodni) przed uwidocznieniem pierwszych radiologicznych dowodów na progresję nowotworu.^{58,59} Są to wprawdzie jedynie wyniki wstępne, świadczą jednak, że genotypowanie ctDNA można wykorzystać, by lepiej zrozumieć powstawanie oporności na leki (patrz niżej), a także śledzić pojawianie się nowych klonów związanych z tworzeniem się przerzutów,

RYCINA 4



RYCINA 4 (na sąsiedniej stronie). Koncepcja wykorzystania DNA osocza do monitorowania obecności DNA nowotworu w krążeniu i ewolucji klonalnej.

W materiale pochodzącym z nowotworu poddanym sekwencjonowaniu metodami nowej generacji można stwierdzić rearanżacje chromosomalne i punktowe składające się na „kod kreskowy” guza (części A i B) wykorzystywane do monitorowania nawrotu lub zakresu rozsiewu. Alternatywą jest bezpośrednie sekwencjonowanie DNA w osoczu, które bywa wykorzystywane do wykrywania nowych mutacji w nowotworowym DNA obecnym w krwi krążącej (ctDNA), co pozwala na wczesne ujawnienie oporności na leczenie ukierunkowane (części C i D). Kolory (i towarzyszące cyfry) oznaczają różne klonny komórkowe. Część A. Hipotetyczny chory na raka płuca poddany terapii z zamiarem wyłączenia polegającej na usunięciu zmienionego płata płuca, u którego rearanżacje chromosomalne obecne we wszystkich komórkach nowotworowych ogniska pierwotnego (np. translokacja *ROS1*) wykorzystano do wczesnego wykrywania nawrotu. Część B. Hipotetyczna chora na raka piersi. Sekwencjonowanie nowotworu usuniętego w trakcie mastektomii wykazało obecność 3 mutacji (oznaczonych cyframi 1, 2 i 3) w różnych frakcjach komórek raka. Gdy pojawią się przerzuty, śledzenie wszystkich trzech mutacji zostanie wykorzystane do monitorowania zakresu rozsiewu różnych klonów w obrębie nowotworu. Dwie z mutacji (2 i 3) wskazują na doskonałą odpowiedź wczesną. Liczba mutacji 1 w DNA osocza nadal wzrasta, co świadczy, że zawierające ją klonny komórkowe nie odpowiadają na leczenie. Część C. Hipotetyczny chory na raka jelita grubego z przerzutami. Pierwotne ognisko nowotworu zawiera gen *KRAS* bez mutacji. Chory rozpoczął leczenie cetuksymabem, a stężenia antygenu karcynoembrionalnego (carcinoembryonic antigen, CEA) świadczą o znakomitej odpowiedzi na stosowanie leku ukierunkowanego przeciw receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Trzy miesiące przed pojawieniem się zwiększonych stężeń CEA wyniki bezpośredniego sekwencjonowania DNA osocza wskazują na rozwój oporności na leczenie, ponieważ zwiększa się stężenie zmutowanych sekwencji genu *KRAS* w osoczu. Część D. Hipotetyczna nosicielka mutacji zarodkowej genu *BRCA1*. Zaawansowany rak szyjki macicy z licznymi przerzutami do jamy brzusznej, w którym test w kierunku mutacji *TP53* w ctDNA (1) wskazuje na bardzo dobrą odpowiedź na leczenie pochodnymi platyny. Po 7 miesiącach bezpośrednie sekwencjonowanie materiału osoczkowego ukazuje pojawienie się mutacji w *BRCA1* prowadzącej do nabycia oporności (2), dostarczając wczesnych informacji o możliwej oporności na leczenie pochodnymi platyny.

zanim staną się one widoczne w badaniach obrazowych. Umożliwia to rozpoczęcie leczenia, gdy rozsiew nowotworu jest jeszcze stosunkowo niewielki. Należy określić czułość i swoistość metody w badaniach przeprowadzonych z udziałem reprezentatywnej grupy chorych oraz w różnych sytuacjach klinicznych.

Pojawienie się oporności na leczenie

Zrozumienie klonalnej ewolucji nowotworów pod selekcyjnym naciskiem stosowanej terapii i przeciwstawianie się jej za pomocą terapii o ukierunkowanym działaniu to dwa największe wyzwania w onkologii.

W leczeniu chorych z nawrotem nowotworu zasadniczą rolę odgrywają poznanie mechanizmu powstania oporności i ustalenie, skojarzenia jakich leków skutecznie zahamują ewolucję klonalną. Realizacja tych celów wymaga przede wszystkim systematycznej oceny materiału pochodzącego z ognisk nowotworu przed rozpoczęciem leczenia, po jego zakończeniu, po którym pozostał nowotwór przetrwały, a także po rozpoznaniu nawrotu (ryc. 4). Każda z metod leczenia o ukierunkowanym działaniu oceniana w badaniach klinicznych, poczynając od stosowania imatynibu, ostatecznie powoduje rozwój oporności u chorych, którzy początkowo na nią odpowiadali.

Określanie profilu genetycznego pozwala na wskazanie mutacji decydujących o rozwoju oporności. Często występują one w genie kodującym białko będące celem terapeutycznym lub w genie kodującym białko, którego aktywność pozwala na omińnięcie następstw zahamowania białka docelowego.⁵⁹⁻⁶⁶ Chociaż może to sugerować niepomyślną przyszłość leczenia o ukierunkowanym działaniu, wskazuje też na konieczność rozwiązania problemu dzięki opracowaniu leków działających przeciw zmutowanym komórkom nowotworowym opornym na lek zastosowany wcześniej,^{60,61} leków hamujących szlak omijający następstwa hamowania białka docelowego⁶² lub skojarzenia leków hamujących rozwój oporności, podobnie jak w celu opanowania zakażenia ludzkim wirusem nabytego niedoboru odporności (human immunodeficiency virus, HIV). Skuteczność takiego postępowania wykazano już u chorych na nowotwór jądra oraz w białaczkach u dzieci, gdzie leżąca u podłoża choroby złożoność klonalna nie jest przeszkodą dla skutecznej chemioterapii. Wyjaśnienie, które z genotypów klonalnych odpowiedzą lub będą odporne na leczenie, dostarczy podstaw dla wyboru połączeń leków skutecznych w badaniach przedklinicznych i klinicznych.

Ocena mutacji i klonów w praktyce klinicznej

W hierarchicznym modelu ewolucji klonalnej wczesne mutacje somatyczne (mutacje w komórkach pnia) cechuje skłonność do propagacji w wielu lub we wszystkich klonach, podczas gdy późniejsze wydarzenia występują jedynie w niektórych klonach (tzw. mutacje kladowe). Mutacje kierujące przebiegiem patogenezy są na ogół uznawane za zdarzenia wczesne, podczas gdy bardziej bezładne mutacje kladowe mogą odpowiadać za dodatkowe cechy nowotworu. Przykładami często spotykanych mutacji pnia są translokacje między genami *BCR* i *ABL* (*BCR-ABL*) w przewlekłej białaczce szpikowej, mutacje aktywujące *KRAS* w raku trzustki, amplifikacje *EGFR* w glejaku wielopostaciowym oraz mutacje utraty funkcji w genie *KIT* w nowotworach podścieliskowych przewodu pokarmowego. Mutacje kladowe mogą

być jednak również mutacjami wiodącymi.⁶³ Większość genomowych testów diagnostycznych nowej generacji wykrywających nowotwory (np. opartych na spektrometrii masowej i sekwencjonowaniu Sangera) cechuje binarność (świadczą o występowaniu danej cechy lub jej braku), nie uwzględnia natomiast proporcji masy nowotworu zawierającej daną cechę (mutację lub powielenie). Takie testy wykrywające mutacje nie odnoszą się zatem do klonalności, a zwłaszcza wykazują tendencję do niewykrywania mutacji kładowych. Wszystkie mutacje somatyczne nowotworu oraz niektóre struktury klonalne można obecnie badać za pomocą głębokiego sekwencjonowania na poziomie całego genomu. W rzeczywistości wymagania dotyczące próbek materiału i samej analizy sprawiają, że metody te nie są jeszcze powszechnie wykorzystywane w praktyce klinicznej, a jedynie w badaniach doświadczalnych.

Jak można byloby wykorzystać w najbliższym czasie analizę klonalną w praktyce klinicznej? Należy sądzić, że niedługo kliniczne laboratoria genomiczne będą dostarczały wyników głębokiego sekwencjonowania określonych regionów prowadzonego w poszukiwaniu mutacji klonalnych, skupiając się na genach lub mutacjach, które klinicznie są już na liście podejrzanych, oraz znanych mutacji uczestniczących w rozwoju cech nowotworowych. Przykładami są mutacje genu *KRAS* wykorzystywane do stratyfikacji chorych na raka okrężnicy podczas ustalania wskazań do leczenia przeciwciałami skierowanymi przeciw EGFR, zestawy mutacji wiodących składające się na „kod kreskowy” danego raka oznaczane w osoczu w celu monitorowania przebiegu nowotworu, a także mutacje genu *EGFR* pozwalające przewidzieć skuteczność leczenia erlotynibem lub gefitynibem. Po uwzględnieniu obecnych kosztów odczynników ocena wstępnie wybranych sekwencji DNA w badanym materiale^{64,65} sprawia, że głębokie sekwencjonowanie 400-500 genów (około 3 Mb liniowej sekwencji) to koszt kilkuset dolarów, chociaż problemy wynikające z regulacji prawnych oraz patentów mogą w niektórych regionach zwiększyć tę kwotę.

WPLYW NA OPRACOWYWANIE NOWYCH LEKÓW I ICH OCENĘ W PRAKTYCE KLINICZNEJ

Możliwość śledzenia ewolucji klonalnej w nowotworach, zarówno w warunkach doświadczalnych, jak i u chorych, stwarza warunki i szansę na opracowanie nowych leków. Ciągłe jeszcze większość projektowanych leków działa przeciw punktom uchwytu ulegającym ekspresji w liniach komórkowych o nieznanym lub tylko częściowo scharakteryzowanym tle genetycznym. Trwają starania zmierzające do poznania genomu linii komórkowych wykorzystywanych obecnie w badaniach

nowych leków,⁶⁶⁻⁶⁸ dla większości z nich brakuje jednak referencyjnego DNA z linii zarodkowej, co utrudnia odróżnienie wariantów linii zarodkowej od wariantów somatycznych. Zróżnicowanie mutacji w nowotworach somatycznych u chorych również nie znajduje dobrego odpowiednika w dostępnych obecnie liniach komórkowych większości podtypów takich nowotworów. Mutacyjny profil nowotworów wskazuje na istnienie szerokiego wachlarza potencjalnych celów terapeutycznych, ale ich indywidualny dobór na podstawie pojedynczych hipotez terapeutycznych jest żmudny. Przez obserwację selekcji ewolucyjnej – zwłaszcza genotypów klonalnych występujących lub niewystępujących u chorych albo w poliklonalnych obcogatunkowych przeszczepach ludzkich nowotworów – należy skupić uwagę na najważniejszych szlakach regulacyjnych. Postęp być może dokona się dzięki prospektywnemu opracowywaniu zsekwencjonowanych poliklonalnych obcogatunkowych przeszczepów ludzkich nowotworów oraz mapowaniu klonalnych genotypów odpowiadających za oporność i wrażliwość na leki u chorych.

Poważnym problemem jest to, że działanie większości leków jest ukierunkowane na pojedynczy punkt uchwytu (lub kilka celów terapeutycznych blisko związanych ze sobą). Ukierunkowanie leczenia jedynie na najczęstszą mutację wiodącą danego nowotworu nie będzie skuteczne, jeśli w mniej licznych klonach nowotworu występują już mutacje odpowiadające za rozwój oporności na taki lek (patrz wyżej). Genetyczne zróżnicowanie nowotworu i jego zdolność do ewolucji oznaczają, że większość terapii ukierunkowanych na pojedynczy cel terapeutyczny prowadzi do selekcji klonów opornych na tę terapię, które zaczynają się rozprzestrzeniać i dominować. W leczeniu chorych zarażonych HIV trwałą kontrolę replikacji wirusa osiągnięto dopiero po opracowaniu trójlekowych koktajli złożonych z leków przeciwvirusowych skutecznie hamujących klonalną ewolucję wirusa. W badaniach poświęconych nowotworom zasadnicze znaczenie ma lepsze poznanie sposobów kojarzenia leczenia ukierunkowanego przeciw różnym celom terapeutycznym. Zdolność do określenia genotypów klonalnych wrażliwych i opornych na wybrane leczenie może być przydatna zarówno na wczesnych etapach prac nad lekiem (badania przeszczepów obcogatunkowych), jak i później (badania I-II fazy).

Analiza molekularna nowotworów prowadzona w warunkach klinicznych nadal jest w powijakach, m.in. dlatego, że poznanie zależności molekularno-klinicznych niezbędnych do podjęcia odpowiednich decyzji zajmuje wiele lat. W pewnych warunkach do działań zniechęca wynik zestawienia kosztów z korzyściami, wskazujący na znaczny koszt opracowania i certyfikacji pewnych testów. Sekwencjonowanie w poszukiwaniu mutacji staje się jednak coraz powszechniejsze w miarę

wprowadzania kolejnych metod leczenia związanych z określonymi mutacjami lub nowych wzorców monitorowania przebiegu choroby. Klonalność nowotworu dostarcza tu nowej jakości. Wykorzystanie jej w analizach będzie wymagało przeglądu oznaczeń markerów biologicznych i metod stratyfikacji. Kolejną możliwością stwarza połączenie czynnościowych badań obrazowych z informacjami dotyczącymi genotypu klonalnego. Przewodzący badania kliniczne powinni zrewidować sposób ich prowadzenia, uwzględniając przy tym biopsje tkanek oraz trwające badania nad ewolucją nowotworu w syntetycznych badaniach klinicznych.

Formularze dotyczące konfliktów interesów dostarczone przez autorów są dostępne wraz z pełnym tekstem artykułu na stronie www.NEJM.org.

Autorzy dziękują Sarah Mullaly za komentarze do wcześniejszych wersji manuskryptu.

From The New England Journal of Medicine 2013;368:842-851. Translated and reprinted in its entirety with permission of the Massachusetts Medical Society. Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

PIŚMIENNICTWO

- Hudson TJ, Anderson W, Artez A, et al. International network of cancer genome projects. *Nature* 2010;464:993-8. [Erratum, *Nature* 2010;465:966.]
- Jones SJ, Laskin J, Li YY, et al. Evolution of an adenocarcinoma in response to selection by targeted kinase inhibitors. *Genome Biol* 2010;11:R82.
- Roychowdhury S, Iyer MK, Robinson DR, et al. Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study. *Sci Transl Med* 2011;3:111ra121.
- Dancey JE, Bedard PL, Onetto N, Hudson TJ. The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell* 2012;148:409-20.
- McDermott U, Downing JR, Stratton MR. Genomics and the continuum of cancer care. *N Engl J Med* 2011;364:340-50.
- Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* 2011;470:187-97.
- Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* 2011;331:1553-8.
- Hauschka TS. Cell population studies on mouse ascites tumors. *Trans NY Acad Sci* 1953;16:64-73.
- Makino S, Kano K. Cytological studies of tumors. IX. Characteristic chromosome individuality in tumor strain-cells in ascites tumors of rats. *J Natl Cancer Inst* 1953;13:1213-35.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-8.
- Sidransky D, Mikkelsen T, Schwchheimer K, Rosenblum ML, Cavanee W, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature* 1992;355:846-7.
- Siegmund KD, Marjoram B, Woo YJ, Tavaré S, Shibata D. Inferring clonal expansion and cancer stem cell dynamics from DNA methylation patterns in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4828-33.
- Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011;146:633-44. Errata, *Cell* 2011;146:1042, 147:1197.]
- Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 2012;21:283-96.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
- Clarke J, Wu HC, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol* 2009;4:265-70.
- Lipson D, Raz T, Kieu A, et al. Quantification of the yeast transcriptome by single-molecule sequencing. *Nat Biotechnol* 2009;27:652-8.
- McKernan KJ, Peckham HE, Costa GL, et al. Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. *Genome Res* 2009;19:1527-41.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008;456:53-9.
- Notta F, Mullighan CG, Wang JC, et al. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature* 2011;469:362-7. [Erratum, *Nature* 2011;471:254.]
- Anderson K, Lutz C, van Delft FW, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 2011;469:356-61.
- Unger MA, Chou HR, Thorsen T, Scherer A, Quake SR. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science* 2000;288:113-6.
- White AK, Vaninsberghe M, Petriv OI, et al. High-throughput microfluidic single-cell RT-qPCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:13999-4004.
- Shah SP, Morin RD, Khattra J, et al. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* 2009;461:809-13.
- Ding L, Ellis MJ, Li S, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* 2010;464:999-1005.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-92. Erratum, *N Engl J Med* 2012;367:976.]
- Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 2011;472:90-4.
- Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, et al. Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome Res* 2010;20:68-80.
- Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 2012;487:239-43.
- Ruiz C, Lenkiewicz E, Evers L, et al. Advancing a clinically relevant perspective of the clonal nature of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:12054-9.
- Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 2010;467:1109-13.
- Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 2010;467:1114-7.
- Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012;486:395-9.
- Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, et al. The life history of 21 breast cancers. *Cell* 2012;149:994-1007.
- Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2012;481:157-63.
- Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012;481:506-10.
- Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012;366:1090-8.
- Mullighan CG, Phillips LA, Su X, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2008;322:1377-80.
- Wu X, Northcott PA, Dubuc A, et al. Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. *Nature* 2012;482:529-33.
- Liu W, Laitinen S, Khan S, et al. Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer. *Nat Med* 2009;15:559-65. [Erratum, *Nat Med* 2009;15:819.]
- Xu X, Hou Y, Yin X, et al. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor. *Cell* 2012;148:886-95.
- Hou Y, Song L, Zhu P, et al. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell* 2012;148:873-85.
- Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein WO, et al. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:38-47.
- Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoeklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010;16:790-9.
- Huyge V, Garcia C, Alexiou J, et al. Heterogeneity of metabolic response to systemic therapy in metastatic breast cancer patients. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010;22:818-27.

46. Kidd EA, Grigsby PW. Intratumoral metabolic heterogeneity of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:5236-41.
47. Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012;486:346-52.
48. Heist RS, Engelman JA. Snapshot: non-small cell lung cancer. *Cancer Cell* 2012;21:448.e2.
49. Molinari F, Felicioni L, Buscarino M, et al. Increased detection sensitivity for KRAS mutations enhances the prediction of anti-EGFR monoclonal antibody resistance in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:4901-14.
50. Maley CC, Galipeau PC, Finley JC, et al. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nat Genet* 2006;38:468-73.
51. Dupont Jensen J, Laenkhölm AV, Knoop A, et al. PIK3CA mutations may be discordant between primary and corresponding metastatic disease in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:667-77.
52. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14:985-90.
53. Leary RJ, Kinde I, Diehl F, et al. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. *Sci Transl Med* 2010;2:20ra14.
54. McBride DJ, Orpana AK, Sotiriou C, et al. Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:1062-9.
55. Press RD, Love Z, Tronnes AA, et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood* 2006;107:4250-6.
56. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 2012;4:136ra68.
57. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, et al. Detection of tumour PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res* 2012;18:3462-9.
58. Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486:537-40.
59. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012;486:532-6.
60. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 2008;22:1200-6.
61. Hazarika M, Jiang X, Liu Q, et al. Tassigna for chronic and accelerated phase Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia resistant to or intolerant of imatinib. *Clin Cancer Res* 2008;14:5325-31.
62. Prahallad A, Sun C, Huang S, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 2012;483:100-3.
63. Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, et al. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell* 2011;20:810-7.
64. Wagle N, Berger MF, Davis MJ, et al. High-throughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing. *Cancer Discov* 2012;2:82-93.
65. Harismendy O, Schwab RB, Bao L, et al. Detection of low prevalence somatic mutations in solid tumors with ultra-deep targeted sequencing. *Genome Biol* 2011;12:R124.
66. Heiser LM, Sadanandam A, Kuo WL, et al. Subtype and pathway specific responses to anticancer compounds in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:2724-9.
67. Garnett MJ, Edelman EJ, Heidorn SJ, et al. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature* 2012;483:570-5.
68. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;483:603-7. [Erratum, *Nature* 2012;492:290.]

KOMENTARZ



Prof. dr hab. n. med.
Janusz A. Siedlecki
Zakład Biologii Molekularnej,
Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie,
Warszawa

W słynnym już artykule pt. „The hallmarks of cancer” z 2000 r. oraz w jego uwspółcześnionej po 10 latach wersji Weinberg i Hanahan opisali proces kancerogenezy ukazując całą jego złożoność. Zgodnie z ich opinią proces transformacji był wynikiem nabywania kolejnych zmian (mutacji i epimutacji) w genach, których produkty uczestniczą w przebiegu takich procesów, jak naprawa uszkodzonego materiału genetycznego, proliferacja, śmierć, a także w różnicowaniu komórek. Chociaż jak się wydaje komórka o fenotypie nowotworowym powstaje w wyniku wielu zmian w jej materiale genetycznym, ze względu na niestabilność genetyczną, w miejsce pojedynczego klonu szybko dochodzi do wzrostu nowotworu zbudowanego z co najmniej kilku klonów komórek o zbliżonym fenotypie. Powstający niewielki, bo liczący sobie 1-2 mm średnicy rozrost nowotworowy zwany *carcinoma in situ*, dla dalszego wzrostu wymaga jednak

unaczynienia, czyli uaktywnienia procesu neoangiogenezy. Wynikiem powstającego unaczynienia jest dalsza selekcja klonalna. Coraz większą przewagę uzyskują klony cechujące się większą zdolnością do przetrwania, co nie zawsze jest równoznaczne z większą agresywnością. Możemy wręcz mieć do czynienia ze zjawiskiem hamowania wzrostu bardziej agresywnych klonów przez klony mniej agresywne, ale np. cechujące się większą zdolnością do przeżycia w warunkach panujących w danym mikrośrodowisku. Rosnący w wyniku zmiany warunków utlenowania i zwiększenia liczby składników odżywczych guz nowotworowy staje się coraz bardziej heterogeny. Odpowiedzią kliniczną na zjawisko heterogenności guza jest wykorzystanie potencjału terapii skojarzonej i chemioterapii wielolekowej.

Zmienność genetyczna w obrębie guza nowotworowego jest tematem omawianego artykułu Aparicio i Caldas. Autorzy zwracają uwagę czytelnika na fakt, że komórki guza ulegają stałym modyfikacjom pod wpływem zmieniających się warunków zarówno w obrębie guza, jak i w otaczającym go środowisku. Przyrównują ten proces do zmienności ewolucyjnej, co nie jest chyba trafnym porównaniem. Ewolucja jest bowiem procesem powolnym, podczas którego przewagę zdobywają te osobniki, które są lepiej przystosowane do zmieniających się warunków środowiska. W guzie nowotworowym zmienność jest wynikiem uszkodzenia systemów stabilizujących stałość materiału genetycznego. To prowadzi

do szybkiego nabywania nowych zmian w klonach o już zmienionym genotypie. Pojawiają się więc klony o identycznym lub zbliżonym genotypie, jednak różniące się szeregiem dodatkowych zmian wpływających na ich zdolność do przeżycia w danych warunkach. Presja selekcyjna eliminuje klony o mniejszej witalności. Gdyby zatem chcieć w sposób modelowy przedstawić wykres heterogenności klonalnej w guzie nowotworowym, prawdopodobnie najlepiej odzwierciedlałby go wykres typu dendrogram. I w tym kontekście rzeczywiście można by mówić o ewolucyjności procesu zmienności genetycznej.

W wyniku niestabilności genetycznej w komórce nowotworowej pojawiają się coraz to nowe zmiany. Z czasem pojedynczym zmianom zaczynają towarzyszyć zmiany epigenetyczne, a jeszcze później aberracje chromosomalne. Funkcje niektórych genów ulegają znaczącej aktywacji, inne ulegają wyciszeniu. Wszystkie te zmiany prowadzą do powstania wielu różnych fenotypów nowotworowych. W takich warunkach mogą pojawić się też klony o fenotypie przypominającym fenotyp odróżnicowany podobny do fenotypu komórek macierzystych. Macierzystość komórek jest ciągle przedmiotem badań. Coraz więcej badaczy przychyli się jednak do zdania, że raczej należy mówić o fenotypie przypominającym macierzystość niż o fenotypie macierzystości. Poza fenotypem przypominającym macierzystość możemy mówić o znaczącej odmienności genotypowej.

Autorzy artykułu zwracają uwagę na fakt, że tak naprawdę dopiero badania prowadzone nowoczesnymi technikami wielkoskalowymi uświadomiły, jak ogromne zróżnicowanie cechuje rozrost nowotworowy. Okazało się, że heterogenność nie tylko dotyczy objętości guza, ale w obrębie guza znajdują się obszary o mocno zróżnicowanej heterogenności. Analiza materiału nowotworowego pobranego z różnych okolic guza wykonana technikami wielkoskalowymi (np. za pomocą mikromacierzy ekspresyjnych) przynosiła czasami skrajnie różne wyniki. Podobnie badania pojedynczych komórek wyizolowanych z tego samego rozrostu wykazały, że jedynie nieliczne zmiany są charakterystyczne dla większości komórek. Pozostałe zmiany obserwowano jedynie sporadycznie. Wydaje się zatem, że wśród zmian w komórkach nowotworowych można wyróżnić co najmniej dwie kategorie. Pierwsza to zmiany inicjujące, czyli takie, które zapoczątkowują proces transformacji i prowadzą do zmiany fenotypu komórki z prawidłowego na nowotworowy. Do drugiej kategorii należą zmiany towarzyszące, czyli prowadzące jedynie do zwiększenia różnorodności w obrębie klonów podstawowych. Na przykład badanie mikromacierzowe czerniaka ujawnia ponad 4000 zmian w wielu różnych genach. Ale 70% czerniaków ma mutacje w genie *BRAF*. W tym przypadku mutację *BRAF* możemy zaliczyć do grupy mutacji inicjujących.

Autorzy artykułu stawiają pytania, na które ciągle jeszcze nie ma definitywnych odpowiedzi. Chodzi przede wszystkim o to, czy właściwe jest stosowanie terapii nakierowanej na cele molekularne. Dotychczasowe korzyści ze stosowania tego typu terapii są bowiem ograniczone. Jak piszą „...każda z metod leczenia ukierunkowanego oceniana w badaniach klinicznych, poczynając od stosowania imatynibu, ostatecznie prowadziła do rozwoju oporności u chorych, którzy początkowo na nią odpowiadali.” Czy zatem ustalenie pełnego profilu genetycznego pomoże określić taki zestaw leków, który nie dopuści do pojawienia się oporności? Z doświadczenia wiemy, że przynajmniej w niektórych przypadkach jest to możliwe.

A może, jak sugerują autorzy omawianego artykułu, należy podejść do terapii inaczej? Może należy opracować takie leki, których spektrum działania będzie skierowane nie przeciw pojedynczemu punktowi uchwytu (ale też nie przeciw celom terapeutycznym blisko związanym ze sobą, np. przeciw dwóm receptorom z tej samej rodziny). Takich leków, które zostałyby specjalnie opracowane, by hamować dwa różne i niezależne od siebie procesy komórkowe, jeszcze nie mamy. Ale wiemy, że niektóre ze stosowanych już leków cechuje właśnie takie zróżnicowane spektrum działania. Przykładem może być wspomniany wyżej imatynib. Trzeba jednak pamiętać, że im szersze spektrum działania leku, tym poważniejsze jego działania niepożądane.

Uświadomienie sobie znaczenia heterogenności genetycznej klonów komórkowych składających się na rozrost nowotworowy podniosło jeszcze jeden, jak się wydaje niezwykle ważny problem związany z diagnostyką – zarówno klasyczną patomorfologiczną, jak i nowocześniejszą molekularną. Zdaniem autorów artykułu dotychczasowa praktyka diagnostyczna obarczona jest dużą nieścisłością. Podejmowanie decyzji terapeutycznych na podstawie badania pojedynczego fragmentu guza może prowadzić do utraty szansy na wyleczenie. I chociaż takie fakty odnotowywano od dawna, wydawało się, że obowiązujące w diagnostyce procedury są wystarczająco dobre, by nie brać tych faktów zbyt poważnie. Diagnostyka oparta na narzędziach wielkoskalowych uświadomiła diagnostom i terapeutom, że należy bardzo poważnie potraktować fakt heterogenności nowotworu. Decyzje terapeutyczne muszą być podejmowane po dogłębnym zbadaniu heterogenności guza. Oznacza to takie zwiększenie liczby preparatów oglądanych przez patomorfologa, by można było mieć pewność co do charakteru guza i jego różnorodności obszarowej. Oznacza także, że diagnostyka molekularna nie może ograniczać się do pojedynczych wycinków. Próbkę do analizy muszą być pobrane z wielu miejsc guza. Ciągle nierozwiązany pozostaje dylemat heterogenności zmian genetycznych. Jak leczyć chorego na nowotwór, na którego różnych obszarach znajdują się fragmenty o odmiennej za-

wartości komórek ze zmianami, przeciw którym opracowano terapię celowaną. Na przykład, czy u chorego na raka jelita grubego należy stosować terapię przeciw EGFR, jeśli komórek z mutacją w genie *KRAS* jest w pewnej okolicy guza mniej niż 15%, a w innym fragmencie np. 75%? Czy podanie przeciwciała przeciw EGFR nie spowoduje rozrostu klonów

nieposiadających mutacji w genie *KRAS*? Czy w trakcie leczenia należy sprawdzać, jak zmieniają się proporcje klonów i w zależności od wyników modyfikować charakter terapii?

Wszystkie te pytania na razie pozostają bez odpowiedzi, ale należy zdawać sobie sprawę, że bez nich nie ma mowy o personalizacji procesu leczenia.

Ciąg dalszy „Sprawdź swoją wiedzę” ze str. 61

11. Według metaanaliz ryzyko nawrotu miejscowego po mastektomii u chorych na nienaciekającego raka przewodowego (DCIS) piersi wynosi:
 - A. Około 5%
 - B. 2-4%
 - C. Około 1,5%
 - D. Mniej niż 1%
 - E. 0%
12. Wykonywanie mastektomii z zachowaniem brodawki piersi u chorych na DCIS piersi jest przeciwwskazane w przypadku:
 - A. Rozległych zmian typu DCIS
 - B. Podotoczkowej lokalizacji zmian
 - C. Wysokiego stopnia złośliwości niezależnie od lokalizacji
 - D. Prawidłowe są odpowiedzi A i B
 - E. Prawidłowe są odpowiedzi A, B i C
13. Do czynników zwiększających ryzyko nawrotu DCIS po operacji oszczędzającej pierś (lumpektomii) zalicza się:
 - A. Duże wymiary pierwotnego ogniska nowotworu
 - B. Pośredni lub wysoki stopień złośliwości
 - C. Wiek poniżej 65 lat
 - D. Prawidłowe są odpowiedzi A i B
 - E. Prawidłowe są odpowiedzi A, B i C
14. Badania kliniczne wskazują, że zastosowanie tamoksyfenu w leczeniu uzupełniającym chorych na DCIS zmniejsza odsetek nawrotów miejscowych o:
 - A. 20%
 - B. 10-15%
 - C. 5%
 - D. Mniej niż 3%
 - E. Nie wpływa na ryzyko nawrotu, a jedynie zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia raka drugiej piersi
15. Wyniki badań klinicznych wskazują, że zastosowanie uzupełniającej radioterapii po lumpektomii z powodu DCIS zmniejsza całkowity odsetek nawrotów miejscowych w ciągu 10 lat o:
 - A. Około 30%
 - B. Około 20%
 - C. Około 15%
 - D. Około 10%
 - E. Mniej niż 5%
16. Badania populacyjne wskazują, że ryzyko rozwoju raka drugiej piersi w ciągu 20 lat obserwacji u chorych leczonych z powodu DCIS wynosi:
 - A. Około 20%
 - B. Około 10%
 - C. Około 5-7%
 - D. Około 3-4%
 - E. Mniej niż 3%

Autorami pytań są:

prof. dr hab. n. med. Andrzej Kawecki, dr hab. n. med. Romuald Krajewski,
prof. nadzw. COI w Warszawie

Opowiedzi na pytania prosimy przysłać na załączonym kuponie (str. 48) do 11 czerwca 2013 r. lub udzielić odpowiedzi na stronie <http://www.podyplomie.pl/testy>

Odpowiedzi tom 10 nr 1 Luty 2013

1. D; 2. E; 3. A; 4. E; 5. A; 6. C; 7. D; 8. E; 9. E; 10. D; 11. D; 12. B; 13. D; 14. C;
15. E; 16. D; 17. A; 18. B; 19. D; 20. B; 21. A; 22. E

