

Využití analýzy fúzních genů metodou cíleného RNA sekvenování jako nástroje pro diagnostiku a terapeutické plánování u dětských pacientů se solidními nádory

Targeted RNA sequencing-based fusion gene analysis as a tool for diagnostics and therapeutic planning in pediatric cancer patients with solid tumors

Pokorná P.¹, Al Tukmachi D.¹, Trachtová K.¹, Pálová H.¹, Adamcová S.¹, Koželková K.¹, Múdry P.², Pavelka Z.², Štěrbá J.², Slabý O.^{1,3}

¹ CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU Brno

² Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

³ Biologický ústav, LF MU Brno

Souhrn

Východiska: Nádorový genom dětských pacientů se vyznačuje řadou charakteristik, které jej značně odlišují od malignit dospělého věku. Mezi tyto charakteristiky patří nízká mutační nálož, významná role epigenetických změn a také četnost výskytu fúzních genů jakožto řídicích prvků kancerogeneze. Fúzní geny vznikají v důsledku několika typů chromozomálních přestaveb, jako jsou translokace, delece, inserce či inverze, a mohou mít celou řadu funkčních dopadů. Ačkoli byly v minulosti studovány především v kontextu hematologických malignit, jejich význam v diagnostice a terapii solidních nádorů neustále narůstá. **Materiál a metody:** U 250 pacientů se solidními nádory z Kliniky dětské onkologie Fakultní nemocnice Brno byla provedena analýza fúzních genů metodou cíleného RNA sekvenování. Sekvenační knihovny byly připraveny s pomocí sady TruSight RNA Pan-Cancer Panel (Illumina, USA), který pokrývá 1385 klinicky relevantních genů. Sekvence knihoven proběhla s využitím NextSeq Mid Output Kit (150 cyklů) na platformě NextSeq 500 (Illumina, USA). Sekvenační čtení byla namapována na referenční genom hg38 s pomocí STAR aligneru s parametry nastavenými tak, aby umožnily detekci fúzních genů. Pro vyhledání fúzních genů byly použity nástroje Arriba a STARfusion a identifikované fúzní geny byly manuálně ověřeny v softwaru IGV. **Výsledky:** Klinicky relevantní fúzní geny byly identifikovány u 25 % pacientů. Největší podíl identifikovaných fúzí tvořily fúze asociované se sarkomy, jako jsou *EWSR1-FLI1*, *PAX3-FOXO1* nebo *SS18-SSX1/2*. Druhou největší skupinu představovaly fúze typické pro nádory CNS, zejména *KIAA1549-BRAF* či jiné fúze aktivující Ras/MAPK signalizaci. U pacientky s renálním karcinomem byla identifikována dosud nepopsaná fúze *DVL3-TFE3*. Celkem 33 % identifikovaných fúzních genů bylo terapeuticky cílitelných a u 2/3 pacientů s terapeuticky cílitelnou fúzí byla nasazena odpovídající léčba. **Závěr:** Analýza fúzních genů má velký přínos v diagnostice, prognostické stratifikaci a terapeutickém plánování pediatrických onkologických pacientů. Použití vysokokapacitních přístupů, jako je RNA sekvenování, umožňuje identifikaci nových fúzních genů a tím také hlubší porozumění komplexním změnám doprovázejícím vznik a rozvoj nádorových onemocnění.

Klíčová slova

fúzní gen – sekvenování nové generace – precizní medicína – dětská onkologie

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NV19-03-00562.

Supported from the programme project of the Ministry of Health of the Czech Republic, reg. No. NV19-03-00562.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare that they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
CEITEC – Středoevropský
technologický institut
Kamenice 753/5
625 00 Brno
e-mail: oslaby@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 12. 7. 2022

Přijato/Accepted: 15. 8. 2022

Summary

Background: Pediatric cancer genome significantly differs from the genome of adult malignancies and is characterized by low tumor mutational burden, the great importance of epigenetic changes, and also the frequent occurrence of fusion genes. Fusion genes arise as a result of several types of chromosomal rearrangements, such as translocations, deletions, insertions, or inversions, and can have a variety of functional impacts. In the past, they were studied mainly in the context of hematological malignancies; however, their importance in the diagnostics and therapy of solid tumors is increasing. **Materials and methods:** In 250 patients with solid tumors from the Department of Pediatric Oncology of University Hospital Brno, an analysis of fusion genes was performed using targeted RNA sequencing. Sequencing libraries were prepared using the TruSight RNA Pan-Cancer Panel (Illumina), which covers 1 385 clinically relevant genes, and sequenced using the NextSeq Mid Output Kit (150 cycles) on the NextSeq 500 platform (Illumina). Sequencing reads were mapped to hg38 using the STAR aligner with parameters set to allow fusion genes detection. Arriba and STARfusion tools were used to search for fusion genes, which were subsequently manually verified in the IGV software. **Results:** Clinically relevant fusion genes were identified in 25% of patients. The largest proportion of fusions identified were fusions associated with sarcomas, such as *EWSR1-FLI1*, *PAX3-FOXO1*, or *SS18-SSX1/2*. The second-largest group was represented by CNS tumor fusions, especially *KIAA1549-BRAF* or other Ras/MAPK-associated fusions. A previously undescribed *DVL3-TFE3* fusion was identified in a renal carcinoma patient. 33% of the identified fusion genes were therapeutically targetable, and 2/3 of patients received corresponding treatment. **Conclusion:** The analysis of fusion genes is of great benefit in the diagnostics, prognostic stratification, and therapeutic planning of pediatric cancer patients. The use of high-throughput approaches such as RNA sequencing enables the identification of novel fusion genes as well as a deeper understanding of the complex changes that are involved in the development of the disease.

Key words

gene fusion – next-generation sequencing – precision medicine – pediatric oncology

Úvod

V uplynulých 10 letech došlo díky studiím zaměřeným na sekvenování nádorového genomu k významnému posunu v objasnění genetického pozadí pediatrických malignit a vytyčení několika zásadních charakteristik, kterými se odlišují od malignit dospělého věku. Mezi tyto charakteristiky patří mimo jiné nízká mutační nálož, velký význam epigenetických alterací a také vyšší četnost výskytu fúzních genů [1]. Fúzní geny vznikají v důsledku interchromozomálních a intrachromozomálních aberací zahrnujících translokace, delece, inserce či inverze. Funkční dopad těchto aberací může spočívat v deregulaci transkripce, vzniku chimérických onkoproteinů či produkci zkráceného proteinu [2]. Jejich objev je spojen především s hematologickými malignitami [3], nicméně postupným bádáním a pokrokem v oblasti molekulárně-biologických metod byly identifikovány také u solidních nádorů [4] a došlo k celkovému nárůstu počtu klinicky relevantních fúzních genů s diagnostickým, prognostickým či prediktivním významem. V klinické praxi jsou k jejich identifikaci využívány především metody fluorescenční *in situ* hybridizace (fluorescence *in situ* hybridization – FISH) a polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (reverse transcription polymerase chain reaction – RT-PCR), postupně se však do-

stává do popředí také metoda cíleného RNA sekvenování. Tato metoda přináší výhodu paralelní detekce více typů fúzních genů a také možnosti objevu dosud nepopsaných přestaveb, z toho důvodu její využití v diagnostice narůstá.

Materiál a metody

Analýza fúzních genů metodou cíleného RNA sekvenování byla provedena u 250 pacientů se solidními nádory z Kliniky dětské onkologie Fakultní nemocnice Brno, kteří byli diagnostikováni v období od září 2016 do května 2022. Všichni pacienti či jejich zákonní zástupci podepsali informovaný souhlas se zařazením do studie. U 214 pacientů byla analýza provedena v rámci komplexní molekulární charakterizace nádorové tkáně spolu s dalšími metodami (celoexomové sekvenování, celotranskriptomové profilování aj.). V rámci kohorty bylo analyzováno 98 nádorů centrální nervové soustavy (CNS), 94 sarkomů, 16 neuroblastomů, 12 lymfomů, 8 karcinomů různého origa a 22 jiných typů solidních nádorů. Celková RNA byla izolována ze zamrazené tkáně či tkáně fixované formalínem a zalité do parafinu (FFPE blok) pomocí mirVANA miRNA Isolation Kit (Invitrogen, USA). Sekvenáčnické knihovny byly připraveny s pomocí sady TruSight RNA Pan-Cancer Panel která pokrývá 1385 klinicky relevantních genů a umožňuje identifikaci

jak známých, tak dosud nepopsaných fúzních genů. Sekvence knihoven proběhla s využitím NextSeq Mid Output Kit (150 cyklů) na platformě NextSeq 500. Sekvenáčnické čtení byla namapována na referenční genom hg38 s pomocí STAR aligneru [5] s parametry nastavenými tak, aby umožnily detekci fúzních genů. Kvalita mapování byla ověřena pomocí nástrojů QualiMap [6] a Picard [7]. Pro vyhledání fúzních genů byly použity nástroje Arriba [8] a STARfusion [9]. Identifikované fúzní geny byly manuálně ověřeny v softwaru IGV [10].

Výsledky

U 63 pacientů (25 %) byla potvrzena přítomnost klinicky relevantního fúzního genu. U pacientů s nádory CNS převládaly fúzní geny aktivující Ras/MAPK signalizaci, které jsou typické pro low-grade gliomy. Nejčastěji detekovanou fúzí byla *KIAA1549-BRAF*, byly však nalezeny také méně typické přestavby, jako *FAM131B-BRAF*, *QKI-RAF1* či *FGFR1-TACC1*.

Druhou nejzastoupenější skupinu tvořily fúze asociované se supratentoriálními ependymomy, které vymezují dvě prognosticky odlišné skupiny YAP1-fúzovaných a ZFTA-fúzovaných (dříve *RELA*-fúzovaných) ependymomů [11]. V rámci kohorty byly identifikovány pouze *ZFTA-RELA* fúze vytyčující prognosticky méně příznivou skupinu. U jedné pacientky vedl nález fúze *MN1-BEND2* k reklasifi-

kaci původní histopatologické diagnózy ependymomu na high-grade neuroepiteliální tumor s *MN1* alterací (dle aktuálně platné WHO klasifikace MN1-alterovaný astroblastom). Ve skupině sarkomů dominovaly fúzní geny *EWSR1-FLI1*, *PAX3-FOXO1* a *SS18-SSX1/2*, které jsou diagnostickými markery odlišujícími jednotlivé skupiny diagnóz. U pacienta s neuroblastomem byla nalezena fúze *RAD21-EIF3H*, která byla dle dostupných dat z databáze TCGA dosud detekována pouze u jednoho pacienta s hepatocelulárním karcinomem. U pacientů s lymfomy byly identifikovány terapeuticky cílitelné fúze *NPM1-ALK* a *ZBTB16-ABL1*. V rámci kohorty pacientů s karcinomy různého origa byla u pacientky s renálním karcinomem detekována dosud nepopsaná fúze *DVL3-TFE3*. Z hlediska potenciálu využití pro terapeutické plánování bylo z 63 identifikovaných fúzí 21 terapeuticky cílitelných (33 %). Jednalo se zejména o fúze s geny *BRAF*, *RAF1*, *FGFR1*, *ABL1* a *NTRK1-3*. U 2/3 pacientů byla nasazena odpovídající léčba v podobě MEK inhibitorů, NTRK inhibitorů a inhibitorů receptorových tyrozinkináz.

Diskuze a závěr

Fúzní geny patří mezi významné řídicí prvky kancerogeneze pediatrických solidních nádorů a jejich studium v uplynulých dekádách umožnilo hlubší porozumění komplexním změnám doprovázejícím vznik a rozvoj nádorových onemocnění. Asociace různých fúzních genů s na první pohled histologicky uniformními nádorovými onemocněními demonstruje jejich diagnostický a prognostický potenciál, který je již reflektován aktuálně platnými verzemi WHO klasifikace vybraných skupin diagnóz [12,13]. Analýza fúzních genů má

také velký význam stran terapeutického plánování vzhledem k tomu, že vybrané fúzní geny jsou zároveň terapeutickými cíli. Nasazení cílené léčby s sebou poté nese možnost dosažení lepších léčebných výsledků oproti standardně používaným postupům [14].

Pro účely naší studie byla zvolena metoda cíleného RNA sekvenování. Jednou z hlavních výhod této metody je možnost identifikace dosud nepopsaných fúzních genů, což bylo demonstrováno nálezem přestavby *DVL3-TFE3*. Fúze genu *TFE3* se popisují v souvislosti s renálním karcinomem, jaterními PEComy či alveolárními sarkomy měkkých tkání [15]. Jejich důsledkem je onkogenní aktivace proteinu TFE3, která spočívá v nekontrolované akumulaci tohoto transkripčního faktoru v jádře buňky a spuštění exprese cílových genů [16]. Právě identifikace nepopsaných fúzních genů, jejichž další studium povede k objasnění přesného funkčního dopadu, společně se snahami o vývoj nových terapeutických strategií cílících na fúzní transkripty, které nejsou ovlivnitelné aktuálně dostupnými léčivy, mohou mít do budoucna velký přínos pro klinický management vysoce rizikových onkologických pacientů.

Poděkování

Děkujeme Centrální laboratoři Bioinformatika a Centrální laboratoři Genomika CEITEC MU podpořené výzkumnou infrastrukturou NCMG (LM2018132, financováno MŠMT ČR) za pomoc při získávání vědeckých dat prezentovaných v tomto příspěvku.

Literatura

1. Sweet-Cordero EA, Biegel JA. The genomic landscape of pediatric cancers: Implications for diagnosis and treatment. *Science* 2019; 363(6432): 1170–1175. doi: 10.1126/science.aaw3535.
2. Mertens F, Johansson B, Fioretto T et al. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(6): 371–381. doi: 10.1038/nrc3947.

3. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243(5405): 290–293. doi: 10.1038/243290a0.
4. Seidal T, Mark J, Hagmar B et al. Alveolar rhabdomyosarcoma: a cytogenetic and correlated cytological and histological study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1982; 90(5): 345–354. doi: 10.1111/j.1699-0463.1982.tb00105_90a.x.
5. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013; 29(1): 15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
6. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2016; 32(2): 292–294. doi: 10.1093/bioinformatics/btv566.
7. Picard Tools – by Broad Institute. [online]. Available from: <https://broadinstitute.github.io/picard/>.
8. Uhrig S, Ellermann J, Walther T et al. Accurate and efficient detection of gene fusions from RNA sequencing data. *Genome Res* 2021; 31(3): 448–60. doi: 10.1101/gr.257246.119.
9. Haas BJ, Dobin A, Stransky N et al. STAR-fusion: fast and accurate fusion transcript detection from RNA-Seq. [online]. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/120295v1>.
10. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 2011; 29(1): 24–26. doi: 10.1038/nbt.1754.
11. Malgouwar PB, Nambirajan A, Pathak P et al. C11orf95-RELA fusions and upregulated NF-κB signalling characterise a subset of aggressive supratentorial ependymomas that express L1CAM and nestin. *J Neurooncol* 2018; 138(1): 29–39. doi: 10.1007/s11060-018-2767-y.
12. Louis DN, Perry A, Wesseling P et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-Oncol* 2021; 23(8): 1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106.
13. Sbaraglia M, Bellan E, Dei Tos AP. The 2020 WHO classification of soft tissue tumours: news and perspectives. *Pathologica* 2021; 113(2): 70–84. doi: 10.32074/1591-951X-213.
14. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S et al. Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N Engl J Med* 2018; 378(8): 731–739. doi: 10.1056/NEJMoa1714448.
15. Argani P, Zhong M, Reuter VE et al. TFE3-fusion variant analysis defines specific clinicopathologic associations among Xp11 translocation cancers. *Am J Surg Pathol* 2016; 40(6): 723–737. doi: 10.1097/PAS.0000000000000631.
16. Yin X, Wang B, Gan W et al. TFE3 fusions escape from controlling of mTOR signaling pathway and accumulate in the nucleus promoting genes expression in Xp11.2 translocation renal cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38(1): 119. doi: 10.1186/s13046-019-1101-7.