

Определение молекулярно-генетических подгрупп медуллобластомы на основании анализа уровня экспрессии генов

А.Е. Друй¹, Л.А. Ясько¹, Д.М. Коновалов¹, А.П. Эктова¹, Э.Ф. Валиахметова²,
Ю.В. Ольшанская¹, А.А. Масчан¹, Г.А. Новичкова¹, Л.И. Папуша¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

² ФГАУ «Национальный научно-практический центр нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва

В основе клинической гетерогенности медуллобластом лежат различия, выявляемые на молекулярном уровне, в виде неодинакового профиля экспрессии генов, метилирования ДНК и мутационного спектра. Выявление данных различий послужило основанием для создания в 2016 году новой классификации опухолей центральной нервной системы, в которой предусмотрено разделение медуллобластом на молекулярно-генетические подгруппы. Принадлежность медуллобластомы к определенной молекулярно-генетической подгруппе определяет исход заболевания, ответ на проводимую терапию, вероятность развития рецидива и прогноз. В настоящей работе представлены результаты использования технологии *NanoString* для определения молекулярно-генетической подгруппы медуллобластом на 65 гистологических образцах.

Ключевые слова: медуллобластома, дети, молекулярно-генетические подгруппы, *NanoString*, прогноз.

Контактная информация:

Друй Александр Евгеньевич, канд. мед. наук, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.

Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
Тел.: 8 (495) 287-6570, доб. 5427
E-mail: Dr-Druy@yandex.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-4-85-89

Identification of medulloblastoma molecular subgroups by gene expression profiling

A.E. Druy¹, L.A. Yasko¹, D.M. Kononov¹, A.P. Ektova¹, E.F. Valiakhmetova², Y.V. Olshanskaya¹,
A.A. Maschan¹, G.A. Novichkova¹, L.I. Papusha¹

¹ Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow
² N.N. Burdenko National Research Center of Neurosurgery, Moscow

Clinical heterogeneity of medulloblastoma is based on differences in the molecular landscape of the tumor, which include gene expression and DNA methylation profiles and mutational spectrum. WHO classification of CNS malignancies developed in 2016 implies segregation of medulloblastoma entity into 4 distinct molecular subgroups: WNT, SHH, group 3 and group 4. This division defines clinical presentation, response to therapy, risk of tumor recurrence and presents a basis for individualized and risk-adapted treatment conduction. Molecular genetic techniques for medulloblastoma subgrouping are based either on gene expression profiling or investigation of whole-genome DNA methylation. Method used in clinical practice should be reliable, fast, undemanding for preanalytic procedures and robust. For these reasons gene expression analysis by *NanoString* technology can be designated. In the current study we present the first Russian experience in the molecular classification of medulloblastoma based on gene expression profiling by *Nanostring* technique. The retrospective analysis of 65 pathologically verified medulloblastoma samples was performed. Among these cases WNT subgroup was revealed in 8, SHH – in 15, group 3 – in 16 and group 4 in 26 patients. The subgroup distribution as well as clinical significance of each tumor type corresponded to the literature data. Notable, that *NanoString* technology allowed achieving reliable data on gene expression from complicated material – formalin-fixed paraffin embedded tissue.

Key words: medulloblastoma, molecular subgroups, prognosis.

Correspondence:

Alexander E. Druy, MD, PhD, senior researcher Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russian Federation. Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
Tel.: +7 (495) 287-6570, ext. 5427
E-mail: Dr-Druy@yandex.ru

В 2016 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) представила новую классификацию опухолей центральной нервной системы (ЦНС), включающую четыре подгруппы медуллобластомы: WNT (*Wingless*), SHH (*Sonic Hedgehog*), подгруппа 3 и подгруппа 4, отличающиеся не только генетическим (экспрессионным, эпигеномным и мутационным) профилем, но и прогнозом, уровнем ответа на терапию и частотой возникновения рецидива [1–3] (табл.). Не вызывает сомнения, что данная классификация станет основой для пересмотра

имеющихся и разработки новых протоколов терапии, поэтому необходима надежная, точная и быстрая методика определения подтипа опухоли.

Существующие сегодня методы исследования с позиции диагностической эффективности определения подгрупп медуллобластомы можно разделить на основные и второстепенные. Результаты основных методов исследования позволяют достоверно классифицировать опухоль, в то время как второстепенные указывают лишь на ее вероятную принадлежность к той или иной молекулярной подгруппе [1, 4, 5].

Таблица

Классификация медуллобластом

(Всемирная организация здравоохранения, 2016 г.)

Медуллобластома генетически идентифицированная	Медуллобластома с активацией WNT	9475/3*
	Медуллобластома с активацией SHH и мутации в гене TP53	9476/3
	Медуллобластома с активацией SHH и TP53 дикий тип	9471/3
	Медуллобластома не-WNT/не-SHH ● медуллобластома, группа 3 ● медуллобластома, группа 4	9477/3*
Медуллобластома гистологически идентифицированная	Медуллобластома классическая	9470/3
	Медуллобластома, десмопластическая/нодулярная	9471-3
	Медуллобластома с обширной нодулярностью	9471-3
	Медуллобластома крупноклеточная/анapластическая	9474-3
Медуллобластома неспецифицированная		9470-3

* Обновленные коды Международной классификации заболеваний в онкологии (ICD-O).

К первой группе технологий относятся исследование профиля экспрессии генов, а также полногеномный профиль метилирования ДНК. Данные методики признаны равнозначными и отражают две стороны процесса транскрипции генов. Гиперметилированные гены имеют низкий уровень экспрессии, гипометилированные ЦНС – высокий [6, 7]. На момент открытия подгрупп медуллобластомы (2006–2008 гг.) исследовали профиль экспрессии большого количества генов (более 18 000) на экспрессионных чипах высокой плотности, что предъявляло высокие требования к качеству анализируемой РНК и существенно усложняло преаналитический этап [6]. В 2012 году P.A. Northcott и соавт. показали, что для надежной классификации медуллобластом достаточно знать уровень мРНК 22 генов, экспрессия которых наиболее значимо различается в клетках опухолей разных подгрупп [8]. Для анализа была выбрана технология *NanoString*, в основе которой лежит гибридизация небольшого специфичного фрагмента мРНК с олигонуклеотидными зондами – репортерным и захватывающим, в результате чего образуется комплекс, состоящий из трех молекул. Репортерный зонд имеет в своем составе цветовой «штрихкод» – уникальную последовательность шести флуорохромов, позволяющих идентифицировать комплекс, а захватывающий зонд несет биотин, обеспечивающий фиксацию комплекса к твердой фазе. В дальнейшем иммобилизованные комплексы подсчитывает флуоресцентный анализатор, а их количество – через этап нормализации по референсным генам – трансформируется в величину экспрессии соответствующих генов. Поскольку участок комплементарного связывания молекулы мРНК и зондов достаточно мал, технология *NanoString* позволяет осуществлять анализ высокофрагментированной РНК, в том числе выделенной из ткани, фиксированной в формалине и залитой в парафиновый блок [9].

К группе второстепенных методов классификации медуллобластом относятся стандартные морфологические и генетические методы. Сочетание ядерной аккумуляции β -катенина и однонуклеотидной замены в экзоне 3 гена *CTNNB1*, которые выявляют с использованием иммуногистохимии и секвенирования по Сэнгеру соответственно, – признак медуллобластомы подгруппы WNT [5]. Результат может быть дополнен определением моносомии 6, но абсолютной специфичностью он не обладает [10, 11]. Нодулярно-десмопластическое гистологическое строение опухоли у детей раннего возраста указывает на принадлежность к подгруппе SHH, однако у более старших пациентов данная зависимость утрачивается. Выявление амплификации гена MYC методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) может служить маркером подгруппы 3, особенно в сочетании с анапластическим гистологическим строением и наличием метастатической диссеминации опухоли. Однако в данном случае чувствительность признаков невысока [5, 10]. Наличие изохромосомы 17q специфично для медуллобластомы подгрупп 3 и 4. При этом необходимо подчеркнуть, что мутации в кодирующей последовательности генов, равно как и аберрации, связанные с изменением числа копий генов или хромосомных регионов (делеции или амплификации), с одной стороны, не являются строго специфичными для той или иной подгруппы, с другой – даже наиболее специфичные аномалии не выявляются в абсолютном числе образцов соответствующего молекулярно-генетического варианта. Таким образом, ни одна из указанных аберраций не может служить основанием для однозначной классификации опухоли в какую-либо подгруппу, а для точной интерпретации должны быть применены современные высокопроизводительные технологии, в особенности для разделения пациентов с опухолями подгрупп 3 и 4, экспрессионный и мутационный спектр которых частично перекрывается, а прогноз принципиально различен [5, 10, 12].

До настоящего времени в России были доступны гистологическое и иммуногистохимическое исследования материала опухоли, выявление отдельных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру, определение хромосомных аберраций и амплификации гена MYC методом флуоресцентной *in situ* гибридизации. С появлением новой классификации ВОЗ этих методов явно недостаточно для стратификации пациентов на группы риска, определения прогноза заболевания и подбора адекватной терапии.

Цель работы – исследование диагностических возможностей технологии *NanoString* для определения молекулярно-генетических подгрупп медуллобластомы в российской когорте пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен ретроспективный анализ клинических и молекулярно-генетических данных 65 пациентов с диагнозом «медуллобластома», верифицированным или подтвержденным в патологоанатомическом отделении Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России в период с 2013 по 2016 год.

Медиана возраста пациентов составила 6,5 года (от 1,5 мес. до 16 лет); 16 пациентов были младше 3 лет. Соотношение мальчиков и девочек – 2,25:1. Медиана наблюдения за пациентами – 25 мес. В отделениях НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева терапию провели 26 пациентам, остальные дети получали терапию в других клиниках. Всем пациентам проводили терапию по различным версиям протокола HIT (в том числе по версии HIT MED 2014). У 20 пациентов к моменту начала терапии наблюдалось метастатическое распространение опухоли (M+ стадия); у 17 пациентов определялась остаточная опухоль после проведенного оперативного лечения (R+ стадия).

Материалом для молекулярно-генетического исследования была ткань, полученная в результате резекции опухоли, фиксированная в формалине и залитая в парафиновый блок. Из фрагмента образца, содержащего не менее 70% ткани опухоли, готовили пять срезов толщиной 10 мкм. После предварительной депарафинизации растворителем *Bio Clear* (*Bio-Optica*, Италия) общую РНК выделяли набором *Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (*Thermo Fisher Scientific*, США) согласно инструкции производителя. Выделенную РНК подвергали количественной и качественной оценке: измерение концентрации методом спектрофотометрии (*Nanodrop 2000*, *Thermo Fisher Scientific*, США) и исследование уровня деградации с помощью электрофореза флуоресцентно меченных фрагментов РНК на микроструйных чипах (*Bioanalyzer 2100*, *Agilent*, Германия) [13]. РНК в количестве 300 нг использовали для исследования экспрессии генов методом *NanoString* по стандартной методике, включая гибридизацию РНК и зондов (16 ч), автоматизированную очистку продуктов гибридизации и подготовку картриджа (иммобилизацию комплексов РНК-зонды) и сканирование на флуоресцентном анализаторе *nCounter* (*NanoString*, США). Панель исследуемых генов была адаптирована по публикации *P.A. Northcott et al.*, 2012 и включала 23 анализируемых и 3 референсных гена [8]. Обработка и анализ результатов сканирования осуществлялась с помощью программного обеспечения *nSolver 3.0* (*NanoString*, США).

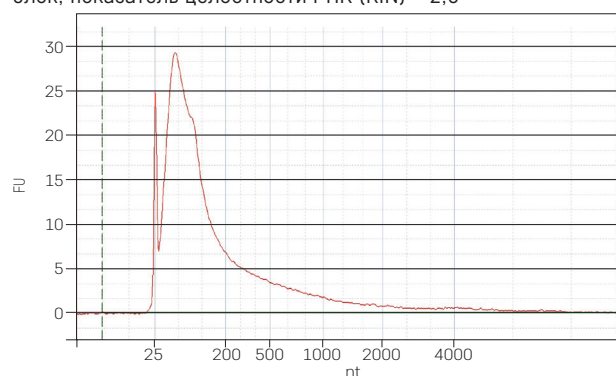
С целью валидации диагностических возможностей метода *NanoString* была сформирована тестовая когорта – 7 пациентов (WNT – 1, SHH – 4, подгруппа 3 – 2 пациента); принадлежность медуллобластомы к молекулярно-генетической подгруппе определяли на основании исследования профиля метилирования ДНК у этих пациентов, а также ряда второстепенных маркеров – наличия мутации в экзоне 3 гена *CTNNB1* и сочетания десмопластического гистологического строения опухоли с ранним возрастом пациента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Используя в качестве анализируемого материала ткань опухоли, фиксированную в формалине и залитую в парафиновый блок, мы ожидали получить небольшое количество фрагментированной РНК. Оказалось, что количество выделенной РНК имело существенные различия в разных образцах и находилось в диапазоне от 675,0 нг до 23,3 мкг (медиана – 3,7 мкг). В основном РНК была представлена короткоцепочечными фрагментами длиной 100 нуклеотидов, рибосомальные пики не визуализировались ни в одном случае, а показатель целостности РНК (RIN) находился в диапазоне от 1,2 до 2,6 (медиана – 2,2). Типичная электрофореграмма образца РНК, выделенной из ткани опухоли, фиксированной в формалине и залитой в парафиновый блок, представлена на рисунке 1.

Рисунок 1

Электрофореграмма образца РНК, выделенной из ткани опухоли, фиксированной в формалине и залитой в парафиновый блок; показатель целостности РНК (RIN) – 2,5



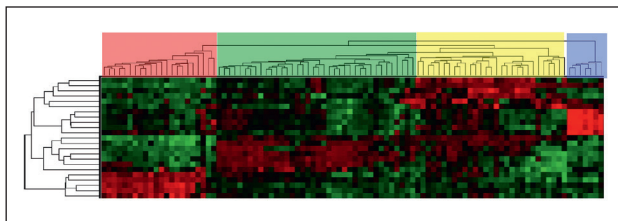
Распределение образцов медуллобластомы на молекулярно-генетические подгруппы в тестовой когорте полностью соответствовало результатам проведенной ранее классификации, что подтвердило диагностические возможности метода *NanoString*.

Величины нормализованной экспрессии генов были подвергнуты агрегативной иерархической кластеризации, которая позволила выделить четыре неперекрывающиеся группы пациентов, в которых экспрессия генов, специфичных для соответствующей молекулярно-генетической подгруппы

медуллобластомы, была наивысшей (рис. 2). Таким образом, анализ экспрессии 23 генов с помощью технологии *NanoString* позволил однозначно классифицировать образцы медуллобластом на молекулярно-генетические подгруппы – WNT, SHH, 3 и 4.

Рисунок 2

Иерархическая агломеративная кластеризация нормализованных величин экспрессии генов позволяет разделить образцы медуллобластомы на молекулярно-генетические подгруппы: WNT (синий кластер), SHH (красный кластер), подгруппу 3 (желтый кластер) и подгруппу 4 (зеленый кластер)



В результате проведенного исследования образцы ткани опухолей пациентов с медуллобластомой были классифицированы следующим образом: подгруппа WNT – 8; подгруппа SHH – 15; подгруппа 3 – 16 и подгруппа 4 – 26 больных.

Медуллобластома подгруппы WNT была определена у 8 пациентов, их средний возраст на момент постановки диагноза составил 10 лет. У одного пациента в дебюте заболевания определялось метастатическое поражение ЦНС, еще у одного – остаточная опухоль после проведенной операции. У большинства пациентов ($n = 7$) был выявлен классический гистологический вариант опухоли, у одного – десмопластический. Семь пациентов данной группы живы; один ребенок погиб (локальный рецидив опухоли).

Опухоль, относящаяся к подгруппе SHH, была обнаружена у 15 пациентов: их средний возраст на момент постановки диагноза – 3 года. Основной гистологический вариант медуллобластомы в данной подгруппе – нодулярно-десмопластический ($n = 12$), однако у двух пациентов верифицировали классическую медуллобластому, а у одного – анапластическую.

Единственным событием в группе детей до 3 лет была смерть, связанная с токсическими осложнениями терапии. У детей старше 3 лет преобладали неблагоприятные события, связанные с заболеванием (прогрессия и рецидив опухоли).

Опухоли молекулярно-генетической подгруппы 3 были выявлены у 16 пациентов исследуемой когорты; их средний возраст на момент постановки диагноза – 4,9 года. Более чем у половины пациентов ($n = 9$) в дебюте заболевания отмечено метастатическое распространение опухоли, а также высокий процент неблагоприятных гистологических вариантов (анапластический вариант и классическая медуллобластома с очагами анаплазии). У двух пациентов выявлена десмопластическая медуллобластома.

У всех детей младшего возраста (менее 4 лет) наблюдалось рефрактерное течение болезни.

Наиболее многочисленной ($n = 26$) в данном исследовании оказалась подгруппа 4, средний возраст пациентов в которой составил 7 лет, а основным гистологическим вариантом был классический тип медуллобластомы ($n = 20$); десмопластический вариант определен в 6 случаях. Неблагоприятные события были зарегистрированы только у пациентов с метастатическим распространением опухоли (M+ стадия).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гетерогенность внутри одного типа опухолей, выявляемая на молекулярном уровне, определяет неодинаковое клиническое течение заболевания, разную вероятность развития рецидива и лежит в основе современных схем стратификации больных на группы риска. Использование данных молекулярной диагностики в клинике предполагает своевременное проведение исследований, отвечающих высоким требованиям достоверности. Это подразумевает получение качественных и репрезентативных образцов на преаналитическом этапе исследования, а также стандартизованной, надежной и воспроизводимой методики анализа. Немаловажным критерием является скорость и трудоемкость обработки полученных результатов исследования и формирование клинического заключения.

Определение молекулярно-генетических подгрупп медуллобластом осуществляется с помощью двух основных групп методов: исследование профиля экспрессии генов или метилирование ДНК на уровне генома. Особенности логистики образцов и сложности стандартизации преаналитического этапа в условиях мультицентрового взаимодействия делают использование свежезамороженной ткани опухоли, предусмотренное этими методиками, чрезвычайно затруднительным, что практически исключает применение биологических чипов высокой плотности для анализа профиля экспрессии генов, требующих РНК высокого качества. В связи с этим ткань опухоли, фиксированная в формалине и залитая в парафиновый блок, является оптимальным исследуемым материалом, позволяющим одновременно проводить и морфологические, и молекулярно-генетические исследования. В то же время ДНК, выделенная из фиксированной ткани, пригодна для анализа профиля метилирования ДНК, позволяющего достоверно разделить образцы медуллобластомы на подгруппы. Среди недостатков этого метода – трудоемкость и значительная продолжительность обработки данных, а также высокая стоимость исследования.

Анализ экспрессии генов с помощью технологии *NanoString* позволяет с относительно небольшими

трудоzатратами использовать высокофрагментированную РНК, выделенную из фиксированной ткани, для получения достоверных результатов. Программное обеспечение дает возможность врачу, не имеющему подготовки в сфере биоинформатики, быстро проводить анализ. Все вышеперечисленное делает данную платформу оптимальной для использования в клинике, что подтверждено при создании стандартизированной системы классификации образцов рака молочной железы с использованием панели PAM50 [14].

В настоящем исследовании были подтверждены диагностические возможности технологии *NanoString* для классификации пациентов с медуллобластомой на молекулярно-генетические подгруппы. Метод продемонстрировал надежное и клинически значимое распределение пациентов.

Выводы

Технология *NanoString* позволяет надежно дифференцировать образцы медуллобластомы различных молекулярно-генетических подгрупп. Метод применим для анализа фрагментированной РНК,

выделенной из фиксированной ткани, и отличается высокой скоростью получения и анализа данных. Разделение пациентов с медуллобластомой на молекулярно-генетические подгруппы клинически значимо, дает возможность прогнозировать вероятность рецидива или прогрессии заболевания. Прогностическая значимость данных маркеров нуждается в валидации в рамках проспективных клинических исследований, но, несомненно, данная классификация станет основой для стратификации пациентов на группы риска в будущих терапевтических протоколах.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Благотворительный фонд «Подари жизнь».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

А.Е. Друй <https://orcid.org/0000-0003-1308-8622>

Л.А. Ясько <https://orcid.org/0000-0003-3007-3772>

Ю.В. Ольшанская <https://orcid.org/0000-0002-2352-7716>

А.А. Масчан <https://orcid.org/0000-0002-0016-6698>

Г.А. Новичкова <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

Л.И. Папуша <https://orcid.org/0000-0001-7750-5216>

Литература

- Coluccia D., Figueredo C., Isik S., Smith C., Rutka J.T. Medulloblastoma: Tumor Biology and Relevance to Treatment and Prognosis Paradigm. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2016; 16 (5): 43–54.
- Taylor M.D., Northcott P.A., Korshunov A., Remke M., Cho Y.J., Clifford S.C., et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2012; 123 (4): 465–72.
- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131 (6): 803–20.
- Northcott P.A., Korshunov A., Pfister S.M., Taylor M.D. The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat Rev Neurol* 2012; 8 (6): 340–51.
- Pietsch T., Schmidt R., Remke M., Korshunov A., Hovestadt V., Jones D.T., et al. Prognostic significance of clinical, histopathological, and molecular characteristics of medulloblastomas in the prospective HIT2000 multicenter clinical trial cohort. *Acta Neuropathol* 2014; 128 (1): 137–49.
- Northcott P.A., Korshunov A., Witt H., Hielscher T., Eberhart C.G., Mack S., et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol* 2011; 29 (11): 1408–14.
- Hovestadt V., Remke M., Kool M., Pietsch T., Northcott P.A., Fischer R., et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. *Acta Neuropathol* 2013; 125 (6): 913–16.
- Northcott P.A., Shih D.J., Remke M., Cho Y.J., Kool M., Hawkins C., et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol* 2012; 123 (4): 615–26.
- Geiss G.K., Bumgarner R.E., Birditt B., Dahl T., Dowidar N., Dunaway D.L., et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature Biotechnology* 2008; 26: 317–25.
- Gajjar A., Bowers D.C., Karajannis M.A., Leary S., Witt H., Gottardo N.G. Pediatric Brain Tumors: Innovative Genomic Information Is Transforming the Diagnostic and Clinical Landscape. *J Clin Oncol* 2015; 33 (27): 2986–98.
- Shih D.J., Northcott P.A., Remke M., Korshunov A., Ramaswamy V., Kool M., et al. Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. *J Clin Oncol* 2014; 32 (9): 886–96.
- Pfister S., Remke M., Benner A., Mendrzyk F., Toedt G., Felsberg J., et al. Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci. *J Clin Oncol* 2009; 27 (10): 1627–36.
- Цаур Г.А., Друй А.Е., Попов А.М., Семенихина Е.Р., Ригер Т.О., Иванова А.С. и др. Возможность использования микроструйных биочипов для оценки качества и количества РНК у пациентов с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. *Вест. уральской мед. академич. науки*, 2011; 4: 107–11.
- Liu M.C., Pitcher B.N., Mardis E.R., Davies S.R., Friedman P.N., Snider J.E., et al. PAM50 gene signatures and breast cancer prognosis with adjuvant anthracycline- and taxane-based chemotherapy: correlative analysis of C9741 (Alliance). *NPJ Breast Cancer* 2016; 2: 15023.