

NOVOSTI V MOLEKULARNI DIAGNOSTIKI NA PODROČJU RAKA JAJČNIKOV

Vida Stegel in Srdjan Novaković

Izvleček

Molekularna diagnostika se pri raku jajčnikov največkrat uporablja za namene odkrivanja napovednih dejavnikov (biomarkerjev), ki napovedujejo odziv na zdravljenje napredovale bolezni s PARP inhibitorji. Med molekularne biomarkerje, ki napovedo odziv na zdravljenje s PARP inhibitorji sodi dokazana patogena različica (PR) ali metilacija genov BRCA1/2 ter za okvaro homologne rekombinacije (HRD) značilna okvara genoma (genomska nestabilnost). V molekularni diagnostiki raka jajčnikov za namen ugotavljanja HRD trenutno izvajamo genotipizacijo BRCA1/2 genov in drugih genov homologne rekombinacije, opredelitev metilacijskega statusa promotorjev genov BRCA1/2 in test za HRD značilne genomske nestabilnosti. Na uspešnost izvedbe metod določanja HRD lahko vpliva kvaliteta DNA in delež tumorskih celic v vzorcu iz katerega se izolira DNA. Slaba kvaliteta DNA in nizek delež tumorskih celic močno povečata možnost lažno negativnega rezultata. Zaželeno je, da je v preiskovanem vzorcu vsaj 70% tumorskih celic. V primeru, da je v vzorcu maj kot 30% tumorskih celic, HRD ni mogoče oceniti.

Molekularna diagnostika se pri raku jajčnikov največkrat uporablja za namene odkrivanja napovednih dejavnikov (biomarkerjev), ki napovedujejo odziv na zdravljenje napredovale bolezni s tarčnimi zdravili. V večini primerov se molekularno genetsko testiranje izvaja pri epitelnih rakih jajčnikov za namen zdravljenja s PARP inhibitorji. Med molekularne biomarkerje, ki napovedo odziv na zdravljenje s PARP inhibitorji, sodijo dokazana patogena različica (PR) v genih BRCA1/2, povečana stopnja metilacije promotorskih regij genov BRCA1/2 in za okvaro homologne rekombinacije (HRD) značilna genomska nestabilnost.

Med epitelne rake jajčnikov uvrščajo serozni karcinom visokega in nizkega gradusa, endometroidni karcinom, svetlocelični karcinom in mucinozni karcinom jajčnika.

Tumorji seroznega karcinoma jajčnikov visokega gradusa (HGSOC) predstavljajo večji del (70%) vseh karcinomov jajčnikov in imajo v 90% mutiran TP53, v 20-25% so prisotne mutacije v genih BRCA1 in BRCA2 (15%- zarodne različice in 7% somatske različice), v manjšem deležu 1-2% tudi mutacije v drugih genih homologne rekombinacije, največkrat v RAD51C/D in BRIP1. Poleg tega je v določenem deležu tumorjev lahko prisotna tudi povišana stopnja metilacije promotorskega gena BRCA1. Med HGSOC ima okvirno 14% pomnožen gen CCNE1. Pomnožitev gena CCNE1 in mutacije v genih BRCA1/2 naj bi se izključevale.

Tumorji seroznega karcinoma jajčnikov nizkega gradusa (LGSOC) predstavljajo 5% vseh karcinomov jajčnikov in imajo pogosto mutacije v genih KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, USP9X, EIF1AX, izgubo 9p in delecijo genov CDKN2A/2B.

Enometroidni karcinom jajčnika (ECOC) predstavlja 10% vseh karcinomov jajčnikov in se lahko pojavlja v sklopu sindroma Lynch. Pri ECOC so najpogostejše mutirani geni v WNT/ β -katenin signalni poti (CTNNB1, 50%), PI3K signalni poti (PIK3CA, 40%; PTEN, 17%), MAPK signalni poti (KRAS, 33%), in SWI/SNF kompleksu (ARID1A, 30%). Poleg tega naj bi bilo v tej skupini rakov jajčnikov okrog 13% tumorjev z okvaro v genih odgovornih za popravljanje neujemanj pri podvojevanju DNA (»mismatch repair« - MMR). Ti tumorji so ponavadi tudi mikrosatelitno nestabilni. Dodatno naj bi bilo med ECOC okrog 5% ultramutiranih tumorjev z mutacijo v genu POLE. Tudi v skupini ECOC se pojavljajo mutacije v genih BRCA.

Svetlocelični karcinom jajčnikov (CCOC) predstavlja 5-10% vseh karcinomov jajčnikov. Najpogostejše so pri CCOC mutirani geni ARID1A (40-50%), PIK3CA (30-40%), TERT promotor (16%), TP53 (<10%), dMMR (<10%), redko se lahko pojavijo tudi mutacije v genih BRCA.

Mucinozni karcinom jajčnikov predstavlja 3-4% vseh primarnih karcinomov jajčnikov. Najpogostejše mutirani geni so KRAS (64%), izguba CDKN2A (76%), TP53 (64%) ter pomnožitve ERBB2 (15-26%).

Molekularno genetsko testiranje pri raku jajčnikov je zaenkrat povezano predvsem z uporabo tarčnih zdravil (PARP inhibitorjev), ki najučinkoviteje delujejo na celice z okvarjeno homologno rekombinacijo.

Glede na to, so PARP inhibitorji odobreni za uporabo pri bolnikih, ki imajo dokazano zarodno ali somatsko mutacijo v genih BRCA, ter v nekaterih primerih (od leta 2019) tudi pri bolnikih, ki imajo v tumorju dokazano za okvaro homologne rekombinacije (HRD) značilno genomsko nestabilnost.

Teste s katerimi dokazujemo HRD lahko razdelimo v tri skupine:

- (1) Testi, ki temeljijo na dokazovanju prisotnosti patognih različic (PR) v genih BRCA1/2, ali na dokazovanju povišane stopnje metilacije genov BRCA1/2. Temu je lahko pridruženo še dokazovanje različic v drugih genih homologne rekombinacije (RAD51C/D, BRIP1/PALB2 itd).
- (2) Specifični testi, ki temeljijo na dokazovanju genomskih strukturnih sprememb, ki se nakopičijo v tumorjih z okvaro homologne rekombinacije HRD, oziroma na merjenju za HRD značilne genomske nestabilnosti (npr. LST – angl. large scale transtions, LOH – angl. loss of heterozygostiy, NtAI – angl. no. of subtelomeric alelic imbalance, GIS – genomic instability scores, in drugo)
- (3) Funkcionalni testi okvare homologne rekombinacije, ki »in vivo« merijo aktivnost homologne rekombinacije na delečih se tumorskih celicah (RAD51) (teoretično naj bi nudili vpogled v trenutno stanje homologne rekombinacije – tudi če je prišlo do ponovne vzpostavitve le-te)

Testi, ki opredeljujejo HRD na osnovi dokazovanja za HRD značilnih genomskih strukturnih sprememb, so osnovani na detekciji več 10000 SNP-jev (angl. single nucleotide polymorphism) razporejenih po celotnem genomu. S pomočjo SNP-jev testi omogočajo zaznavanje porušenega

razmerja alelov (angl. allelic imbalance) in spremembe v številu kopij. Na osnovi tega omogočajo izračun LST, LOh in NtAI ter izračun stopnje genomske nestabilnosti - GIS. Testi, ki temeljijo na teh parametrih so MyChoice® CDx Myriad HRD Companion Diagnostic Test (Myriad), TruSight Oncology 500 HRD (Illumina), in različne »in house« metode določanja HRD na osnovi SNP-mikromrež. Drug način dokazovanja za HRD značilnih genomskih strukturnih sprememb temelji na sekvenciranju celotnega genoma z nizko pokritostjo. Primer takega testa je SOPHiA DDM™ Dx HRD (Sophia Genetics). Tako en kot drugi način določanja HRD, informaciji o genomski nestabilnosti (GIS)/integriteti (GII) (ocena temelji na genomskih strukturnih spremembah) dodata informacijo o patogenih različicah v genih BRCA1/2. Testi opredelijo HRD kot prisoten/zelo verjeten, če so prisotne za HRD značilne genomske strukturne spremembe (visok GIS >42, oz pozitiven GII) in/ali je v tumorju prisotna patogena različica v genih BRCA1/2.

Z genotipizacijo genov BRCA1/2 v tumorjih odkrijemo približno dve tretjini (60%) vseh HRD pozitivnih tumorjev jajčnikov z dokazano genomsko nestabilnostjo. Dodatno četrtno jih zaznamo s testiranjem metilacijskega statusa promotorjev genov BRCA1/2. Del preostanka HRD - genomsko nestabilnih tumorjev jajčnikov predstavljajo tumorji s PR v ne-BRCA genih homologne rekombinacije (ne-BRCA HR geni), pri delu tumorjev ostaja vzrok za HRD nepojasnen. Prisotnost PR v ne-BRCA HR genih v tumorju še ne pomeni nujno, da ima tumor HRD. V tumorjih s PR v ne-BRCA HR genih je smiselno uporabiti metodo, ki določa HRD na osnovi za HRD značilne genomske nestabilnosti (GIS).

Na uspešnost izvedbe metod določanja HRD lahko vpliva kvaliteta DNA in delež tumorskih celic. Zaželeno je, da je v preiskovanem vzorcu vsaj 70% tumorskih celic. V primeru, da je v vzorcu maj kot 30% tumorskih celic, HRD ni mogoče oceniti.

Za HRD značilna okvara genoma še ne pomeni, da je homologna rekombinacija še vedno okvarjena, niti ne pomeni nujno odziva na zdravljenje z zaviralci PARP. Tekom napredovanja tumorja so lahko potekali procesi, ki obnovijo delovanje homologne rekombinacije ali je prišlo do razvoja drugih mehanizmov rezistence na zaviralce PARP. Metode določanja HRD na osnovi ugotavljanja nastalih genomskih sprememb ali genotipizacije/metilacije tega procesa ne zaznajo vedno. Kakšno je dejansko stanje homologne rekombinacije v trenutku preiskovanja, lahko določamo le s funkcionalnimi testi, ki temeljijo na spremljanju procesov homologne rekombinacije v živih gojenih tumorskih celicah.

Literatura

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Female genital tumours [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020 [cited 20230406]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 4). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/34>.
2. NOVAKOVIĆ, Srdjan. Molekularnobiološke značilnosti ginekoloških rakov in raka dojk. V: TAKAČ, Iztok (ur.), ARKO, Darja. Ginekološka onkologija. 1. izd. Maribor: Univerzitetna založba Univerze, 2020. Str. 49-56, ilustr. ISBN 978-961-286-330-2. [COBISS.SI-ID 512970296]
3. González-Martín, A. et al. (2023) 'Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up', *Annals of Oncology*, 34(10), pp. 833–848. doi: 10.1016/j.annonc.2023.07.011.
4. Miller, R. E. et al. (2020) 'ESMO recommendations on predictive biomarker testing for homologous recombination deficiency and PARP inhibitor benefit in ovarian cancer', *Annals of Oncology*, 31(12), pp. 1606–1622. doi: 10.1016/j.annonc.2020.08.2102.
5. Pujade-Lauraine, E. et al. (2023) 'Homologous Recombination Repair Gene Mutations to Predict Olaparib Plus Bevacizumab Efficacy in the First-Line Ovarian Cancer PAOLA-1/ENGOT-ov25 Trial', *JCO Precision Oncology*, (7). doi: 10.1200/PO.22.00258.
6. Swisher, E. M. et al. (2021) 'Molecular and clinical determinants of response and resistance to rucaparib for recurrent ovarian cancer treatment in ARIEL2 (Parts 1 and 2)', *Nature Communications*, 12(1), p. 2487. doi: 10.1038/s41467-021-22582-6.
7. van Wijk, L. M. et al. (2022) 'RAD51 as a functional biomarker for homologous recombination deficiency in cancer: a promising addition to the HRD toolbox?', *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 22(2), pp. 185–199. doi: 10.1080/14737159.2022.2020102.