

Molekularno genetsko testiranje pri raku telesa maternice

Molecular genetic testing in uterine neoplasms

Vida Stegel, Srdjan Novaković

Povzetek

V grobem tumorje telesa maternice delimo na endometrijske epitelne, mezenhimske, mešane epitelne in mezenhimske in druge. Karcinom endometrija, ki sodi med epitelne tumorje, predstavlja večino (80-90 %) vseh malignih bolezni telesa maternice. Sarkomi predstavljajo 2-5 % vseh malignih bolezni telesa maternice. Molekularno genetske preiskave se pri obravnavi tumorjev telesa maternice uporabljajo za namen odkrivanja različic/markerjev pomembnih za diagnozo, prognozo ali zdravljenje bolezni. Pato-histološka klasifikacija karcinoma endometrija je v preteklosti temeljila predvsem na morfoloških značilnostih tumorja, v zadnjem času pa se je izoblikovala histološko-molekularna klasifikacija, ki upošteva tudi molekularne značilnosti tumorja. Upoštevajoč molekularno klasifikacijo TCGA (The Cancer Genome Atlas), pri karcinomih endometrija ločimo med POLE-ultramutirani tumorji, mikrosatelitno nestabilnimi tumorji, tumorji s številnimi spremembami v številu kopij genov in tumorji z maloštevilnimi spremembami v številu kopij genov. Molekularne podskupine karcinoma endometrija so tudi neodvisen prognostični dejavnik. Določene molekularne genetske lastnosti vplivajo tudi na izbiro zdravljenja.

Ključne besede: rak telesa maternice, karcinom endometrija, genetsko testiranje, mutacija, mikrosatelitna nestabilnost

1. Uvod

V grobem tumorje telesa maternice delimo na endometrijske epitelne, mezenhimske, mešane epitelne in mezenhimske ter druge tumorje. Karcinom endometrija, ki sodi med epitelne tumorje, predstavlja večino (80-90 %) vseh malignih bolezni telesa maternice. Sarkomi telesa maternice predstavljajo 2-5 % vseh malignih bolezni telesa maternice. Molekularno genetske preiskave se pri obravnavi tumorjev telesa maternice uporabljajo za namen odkrivanja različic pomembnih za diagnozo, prognozo ali zdravljenje bolezni.

Pato-histološka klasifikacija endometriskega karcinoma je v preteklosti temeljila predvsem na morfoloških značilnostih tumorja, v zadnjem času pa se je izoblikovala histološko-molekularna klasifikacija, ki upošteva tudi molekularne značilnosti tumorja. Molekularna klasifikacija karcinomov endometrija je narejena na osnovi TCGA klasifikacije (angl. The Cancer Genome Atlas). TCGA klasifikacija opredeljuje sledeče molekularne podskupine, ki imajo vsaka značilen molekularni profil in različno prognozo bolezni (POLE mutirani, mikrosatelitno nestabilni, »copy number low«-CNL- skupina z malo spremembami v številu kopij genov in »copy number high«-CNH skupina s številnimi spremembami v številu kopij genov). Razviti so bili markerji, ki omogočajo detekcijo analognih molekularnih podskupin. Ti markerji so mutacije v eksonukleazni domeni POLE, okvare »mismatch repair«- MMR proteinov (dMMR) ali mikrosatelitna nestabilnost (MSI) in okvara ali spremenjeno izražanje TP53 proteina.

2. Molekularno genetske preiskave pri tumorjih telesa maternice

Molekularno genetske metode se v kombinaciji z imohistokemijo uporabljajo za določanje markerjev, na osnovi katerih lahko razvrstimo karcinome endometrija v molekularne podtipе. V okviru molekularno genetskih preiskav, ki jih izvajamo pri mezenhimskih tumorjih, najpogosteje sarkomih telesa maternice določamo specifične genetske spremembe (mutacije, fuzijske transkripte), ki so v pomoč pri potrjevanju ali izključevanju posameznih histoloških podtipov.

2.1. Testiranje mutacij v eksonukleazni domeni gena POLE (POLEmut)

Testiranje na prisotnost mutacij v POLE se izvaja s sekvenciranjem eksonukleazne domene POLE ali z določanjem »hot-spot« mutacij z RT-PCR. Med klinično pomembne mutacije v genu POLE sodijo le nekatere mutacije v eksonukleazni domeni proteina POLE. Do sedaj je jasna povezava med mutacijo in ultramutiranim fenotipom je dokazana pri 11 t.i. hot spot mutacijah gena POLE (P286R, V411L, S297F, S459F, A459P, F367S, L424I, M295R, P436R, M444K, D368Y). Pri ostalih manj pogostih mutacijah eksonukleazne domene POLE je potrebna previdnost pri interpretaciji. Napačna ocena patogenosti POLE mutacije bi lahko vplivala na napačno oceno prognoze bolni. Prisotnost klinično pomembne mutacije v POLE uvrsti tumor v skupino ultramutiranih tumorjev karcinomov endometrija z dobro prognozo.

2.2. Testiranje mikrosatelitne nestabilnosti (MSI) ali izražanja MMR proteinov (dMMR)

Testiranje okvare MMR popravljalnih mehanizmov se izvaja z molekularno genetskim testiranjem mikrosatelitne nestabilnosti (MSI) ali z imunohistokemičnim barvanjem (IHC) proteinov MMR (MLH1, PMS2, MSH6, MSH2) v tumorju. Pri določanju MSI ocenjujemo prisotnost genetskih sprememb (predvsem delecij) v mononukleotidnih zaporedjih. Izvajamo jo z metodo PCR (pomnoževanje 5-6 mononukleotidnih markerjev), ki ji sledi fragmentna analiza. Testiranje MSI/dMMR se izvaja z različnimi nameni.

- (1) za namen klasifikacije v molekularni podtip karcinoma endometrija, ki hkrati predstavlja tudi prognostično informacijo pri bolnicah s POLE negativnimi tumorji.
- (2) lahko za namen presejanja za sindrom Lynch - v tem primeru pri dMMR tumorjih z izgubo MLH1/PMS2 je priporočeno opraviti tudi test metilacije promotora MLH1, da se izključi večji del sporadičnih tumorjev in s tem opredeli bolnike, pri katerih je večja verjetnost, da so nosilci zarodnih patogenih različic v MMR genih (dednega Lynch sindroma). Take bolnike je priporočeno napotiti na genetsko svetovanje in testiranje zarodnih mutacij. Manjši delež mutacij v MMR genih predstavljajo sporadične mutacije nastale v tumorju.
- (3) za namen zdravljenja - dMMR karcinomi endometrija so primerni za zdravljenje z inhibitorji imunskih kontrolnih točk. Približno 10 % dMMR karcinomov endometrija nastane zaradi sindroma Lynch, zaradi zarodnih mutacij v genih MLH1, PMS2, MSH6, MSH2 ali EPCAM. Smernice za odkrivanje sindroma Lynch priporočajo IHC MMR testiranje pri vseh karcinomi endometrija. Ujemanje rezultatov IHC MMR in testiranja MSI je 93-95 %. Pri karcinomi endometrija izziv predstavljajo mutacije gena MSH6. Tumorji z mutacijami v MSH6 imajo velikostno manjše spremembe v mononukleotidnih zaporedjih in lahko dajejo sliko MSI-stabilnega tumorja. Spremembe mikrosatelitov naj bi bile v tumorjih karcinomov endometrija lahko manjše, bolj subtilne, kot pri tumorjih kolorektalnega raka in zahtevajo izkušenega

ocenjevalca in primerjavo z netumorskim tkivom. Metoda IHC je v tem primeru ustreznejša.

2.3. Določanje okvare alispremenjeno izražanje TP53 (TP53abn)

Določanje okvare TP53 (TP53abn) se lahko izvaja z IHC barvanjem ali s sekvenciranjem gena TP53. Skladnost med IHC in sekvenciranje TP53 je 90,7-92,3 %. Različne vzorce IHC barvanja povezujejo z značilnimi genetskimi spremembami; missense mutacije, ki povzročijo zamenjavo aminokislina, so povezane z difuznim barvanjem in močno pozitivnim jedrom; mutacije, ki povzročijo premik bralnega okvirja in nastanek stop kodona, povzročijo odsotnost ekspresije; mutacije c-terminalni ali tertamerizacijski domeni povzročijo povečano ekspresijo v citoplazmi. Izraz subklonska populacija TP53abn naj bi bil uporabljen v primeru, da ima na osnovi IHC barvanja <10 % tumorja TP53abn v ozadju normalnega TP53 proteinskega izražanja. V tem primeru pri sekvenciranju tumorjev pričakujemo mutacije v TP53 pri nižjih alelnih frekvencah (<10 %). Subklonsko TP53abn se pogosteje pojavlja pri POLE mutiranih in dMMR tumorjih. Klinični pomen ni znan. Predpostavljajo, da mutacija v genu TP53 ni gonilna mutacija.

Na osnovi rezultatov testiranja mutacij v genu POLE, dMMR/MSI in določanje okvare TP53 je možna klasifikacija endometriskih karcinomov v molekularne podskupine: POLE-ultramutirani tumorji, tumorji z okvaro MMR proteinov (dMMR-deficient mismatch repair genes), tumorji z neobičajnim IHC barvanjem TP53 (TP53abn), tumorji brez specifičnega molekularnega profila (NSMP-no specific molecular profile).

Tumorji, ki imajo dokazano kombinacijo sprememb značilnih za posamezno molekularno skupino, označujejo kot karcinom endometrija z multiplimi klasifikatorji npt: POLEmut-TP53abn, dMMR-TP53mut, POLEmut-dMMR-TP53abn). Ocenjujejo, da je takih 3-7 % karcinomov endometrija.

Molekularne podskupine karcinoma endometrija so tudi neodvisen prognostični dejavnik. POLE mutirani karcinomi endometrija imajo dobro prognozo, dMMR in NSMP karcinomi endometrija imajo srednje dobro prognozo in TP53abn karcinomi endometrija imajo slabo prognozo.

Nova WHO klasifikacija 2020 uvaja molekularne podtipе predvsem pri endometrioidnem podtipu EC, vendar je v uporabi tudi pri drugih histoloških podtipih karcinoma endometrija predvsem za oceno prognoze bolezni. V določenih primerih lahko molekularne podskupine karcinoma endometrija usmerjajo tudi odločitve o zdravljenju.

2.4. Testiranje specifičnih genetskih sprememb (mutacij, fuzijskih transkriptov), ki so v pomoč pri potrjevanju ali izključevanju posameznih histoloških podtipov

Testiranje specifičnih genetskih sprememb izvajamo s sekvenciranjem druge generacije, običajno s širšim panelom genov, ki vsebuje paleto klinično pomembnih genov. Sekvenciranje DNA izvajamo ločeno. Na oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana se za genotipizacijo tumorske DNA v primeru sekvenciranja NGS poslužujemo panel TruSight Oncology 500-DNA (Illumina) in za genotipizacijo RNA pa panela ArcherFusionPlex Sarcoma (Archer) ali TruSight Tumor 170 panela (Illumina). Pri genotipizaciji tumorjev z večjimi paneli, je mogoča tudi ocena tumorskega bremena.

3. Molekularno genetske spremembe pri nekaterih histopatoloških tipih tumorjev telesa maternice

3.1. Epitelni tumorji endometrija

3.1.1. Karcinom endometrija

Endometroidni karcinom endometrija (EEC) predstavlja približno 70-80 % vseh novo diagnosticiranih rakov telesa maternice. Poleg drugih dejavnikov tveganja (izpostavljenost estrogenu, debelost) je dejavnik, ki poveča tveganje za nastanek EEC tudi družinska anamneza karcinoma endometrija in s tem povezani sindromi dednih rakov, kot sta sindrom Lynch (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) in Cowden (PTEN).

Znotraj endometroidnega karcinoma endometrija so štirje molekularni podtipi:

- POLE-ultramutiran endometroidni karcinom
- endometroidni karcinom z okvarjenim MMR MSI
- TP53 mutiran endometroidni karcinom
- Endometroidni karcinom brez specifičnega molekularnega profila/značilnosti (angl. no specific molecular profile-NSMP). NSMP EEC imajo normalno izražen TP53 in MMR proteine in so brez mutacij v POLE. Načeloma naj bi bili analogni skupini z malim številom sprememb v številu kopij genov po TCGA klasifikaciji – CNL. Skupina ni homogena. Pri teh tumorjih lahko najdemo amplifikacije 1q2,27 ali mutacije v eksonu 3 gena CTNNB1, ki so prognostično neugodne. V primeru detekcije mutacij v CTNNB1 naj bi bile molekularno genetske metode boljše od IHC.

Drugi najpogostejše mutirani geni pri EEC so PTEN (> 50 %), PIK3CA (30 %), PIK3R1 (20-40 %), ARID1A (40 %), KRAS (20 %), TP53 (30 %). Izguba izražanja ARID1A, PTEN ali MMR genov govori v prid EEC visokega gradusa. Mutacije v genu TP53 ali abnormalno izražanje TP53 se pri EEC nizkega gradusa pojavljajo v 2-5 % in v 20 % pri EEC visokega gradusa. EEC visokega gradusa se pojavlja pri vseh molekularnih podtipih.

Serozni karcinom endometrija (SEC) predstavljajo le 10 % vseh karcinomov endometrija. Lahko je povezan z zarodnimi ali somatskimi mutacijami v genih BRCA1/2. Večina tumorjev SEC ima mutiran TP53. Drugi najpogostejše mutirani geni pri EEC so PIK3CA, PP2R1A, in FBXW7. V 30 % tumorjev SEC je pomnožen gen ERBB2 (HER2), pomnožitev je običajno heterogena. Med SEC so redko mutirani/okvarjeni PTEN; CTNNB1 (β -catenin) ARID1A ali MMR. Glede na skupine TCGA sodijo vsi SEC v skupino »copy number-high«.

Svetlocelični karcinom endometrija je redek tip tumorja in predstavlja manj kot 10 % karcinomov endometrija. Molekularno so zelo heterogeni in se lahko prekrivajo s SEC ali EEC ali obema. Pri tem tipu tumorja so detektirane mutacije v genih TP53 (36–59 %), PP2R1A (16–37 %), PIK3CA (11–36 %), PIK3R1 (16–21 %), KRAS (11–14 %), ARID1A (15.9–27 %), in SPOP (14–18 %). Poročila o zaznanih mutacijah v genih PTEN, POLE in dMMR so zelo nasprotujoča, PTEN mutirani (0–14 %), POLE mutirani (0–7 %), dMMR (0–33 %), medtem ko naj bi bilo MSI-H 11-14 %.

Nediferencirani in dediferencirani karcinomi endometrija so zelo redki, predstavljajo le 2 % vseh endometrijskih karcinomov. Tako dediferenciran kot nediferenciran karcinom sta klonsko

povezana z diferenciranim karcinomom. Dve tretjini dediferenciranih in polovica nediferenciranih karcinomov je dMMR ali mikrosatelitno nestabilnih.

Več kot polovica tumorjev ima mutacije v PI3K signalni poti, ki vključuje PTEN, PIK3CA in/ali PIK3R1, ki so hkrati prisotni v diferencirani in nediferencirani komponenti.

V dveh tretjinah dediferenciranih in polovici nediferenciranih karcinomov so mutacije prisotne v proteinih SWI/SNF kompleksa, kar vključuje SMARCA4, SMARCB1 in oba ARID1A in ARID1B. Tumorji z okvarami v SWI/SNF kompleksu so agresivnejši kot tisti brez sprememb v SWI/SNF kompleksu.

Mešani karcinom endometrija je redek. Med njimi se najpogosteje pojavlja mešan endometroidni in serozni karcinom, ki predstavlja 10 % karcinomov endometrija. Nekateri mešani karcinomi endometrija so sinhrono nastali tumorji, ki niso biološko povezani. Drugi pa so nastali z divergentno diferenciacijo ali progresom iz endometroidnega karcinoma nizkega gradusa. V tem primeru ima vsaka komponenta specifične genetske spremembe, in hkrati nekatere, ki so skupne obema komponentama.

Drugi karcinomi endometrija. Mezonefrični in mezonefričnemu podobni adenokarcinomi imajo v velikem deležu mutacijo v KRAS genu in imajo pomnožen 1q krak, manjši delež ima mutiran gen ARID1A. Te mutacije sicer niso specifične. Primarni skvamoznocelični karcinom endometrija nima značilne molekularne slike, razen v redkih primerih prisotnost visokorizičnega HPV. Gastrointestinalni tip karcinoma endometrija ima lahko okvaro MMR proteinov/genov.

Karcinosarkom telesa maternice. Karcinosarkomi predstavljajo 5 % vseh malignih bolezni telesa maternice. V karcinomski in sarkomski komponenti so prisotne iste genetske spremembe. Mutacije v TP53 so prisotne v 90 % karcinosarkomov, podobno kot pri seroznem karcinomu endometrija. Pri karcinosarkomih endometrija so pogosto prisotne mutacije v genih PIK3CA (35 %), PTEN (19 %), PIK3R1 (11 %), FBXW7 (28 %), PPP2R1A (28 %), CDH4 (18 %), KRAS (12 %), ARID1A (12 %), ARHGAP35 (11 %), SPOP (7 %), RB1 (11 %) in U2AF1 (4 %). Glede na TCGA klasifikacijo bi bila večina (60-78 %) endometrijskih karcinosarkomov klasificirana v skupino z obsežnimi spremembami v št. kopij (CNH), 22-38 % v skupino z malo spremembami v številu kopij (CNL) in manj kot 5 % je ultramutiranih (mutacije v POLE) ali hipermutiranih (dMMR).

3.2. Mezenhimski tumorji telesa maternice

Tip tumorja telesa maternice	Genetske spremembe/značilnosti v tumorju
Tumorji gladkih mišic	
Leiomiom telesa maternice	MED12, HMGA2 in HMGA1 - preureditve, COL4A5 in COL4A6 - delecije, in mutacije v FH., delecija dela kromosoma 7q22, 22q delecija, 1p delecija. mutacije v genih TP53 in RB1, KAT6B-KANSL1
Gladkomišični tumor telesa maternice z	

neznanim malignim potencialom (STUMPs)	Mutacije v MED12 se tu pojavljajo zgolj v 10 %.
Metastazirajoči leiomiom	mutacije vMED12, delecije 19q in 22q.
Leiomiosarkomi telesa maternice	TP53 (30 %), ATRX (25 %), in MED12 (20 %).
<i>Stromalni tumorji endometrija</i>	
Endometrijski stromalni nodus	70 % tumorjev ima JAZF1-SUZ12
Stromalni sarkom endometrija nizkega gradusa	fuzija JAZF1-SUZ12, in redkeje tudi JAZF1-PHF1, EPC1-PHF1, in MEAF6-PHF1 MBTD1-EZH1P (CXorf67), BRD8-PHF1, EPC2-PHF1, aEPC1-SUZ12 in BRD8-PHF1,
Stromalni sarkom endometrija visokega gradusa	YWHAЕ-NUTM2A/B, ZC3H7B-BCOR, in interne tandemske duplikacije v zadnjem eksonu gena BCOR (BCOR-ITD). redkejše so fuzije EPC1-BCOR, JAZF1-BCORL1, BRD8-PHF1.
Nediferenciran sarkom telesa maternice	fuzij v JAZF1, NTRK ter ZC3H7B-BCOR, YWHAЕ-NUTM2 (FAM22) in BCOR ITD je lahko v pomoč pri diagnostiki za izključevanje drugih diagnoz.
<i>Drugi mezenhimski tumorji</i>	
Tumor telesa maternice, ki je podoben ovarijskemu tumorju strome spolnega grebena	fuzije v genih ESR1 in GREB1 z različnimi partnerskimi geni , vključno z NCOA1, NCOA2, NCOA3, CTNNB1, NR4A3, in SS18.
Perivaskularni epiteloïdno-celični tumorji (PEComa)	mutacije v TSC1/TSC2, fuzije v TFE3, RAD51B, ali HTR4-ST3GAL1. Mutacije v TSC1/2 in fuzije v TFE3 naj bi se izključevale.
Vnetni miofibroblastni tumorji (Inflammatory myofibroblastic tumour -IMT)	95 % pozitivni za ALK, preureditev gena ALK, fuzije s partnerskimi geni IGFBP5, THBS1, in TIMP3. Pri ALK-negativnih IMT telesa maternice so zgolj v posameznih primerih dokazali ETV6-NTRK3 ali RET fuzije.
<i>Mešani epitelni in mezenhimski tumorji</i>	
Adenomiom telesa maternice	Ti tumorji naj nebi imeli mutacij v eksonu 2 gena MED12

Atipični polipoidni adenom	/
Adenosarkomi telesa maternice	pomnožitve 8q13 in MYBL1, ponekod NCOA2/3 fuzije in TP53 mutacije.
Drugi tumorji telesa maternice	/

Povzeto po WHO klasifikaciji rakov telesa maternice 2020.

4. 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. Concin, N. et al. (2021) 'ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma', International Journal of Gynecologic Cancer, 31(1), pp. 12–39. doi: 10.1136/ijgc-2020-002230.
 4. León-Castillo, A. (2023) 'Update in the molecular classification of endometrial carcinoma', International Journal of Gynecologic Cancer, 33(3), pp. 333–342. doi: 10.1136/ijgc-2022-003772.
 5. Oaknin, A. et al. (2022) 'Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up', Annals of Oncology, 33(9), pp. 860–877. doi: 10.1016/j.annonc.2022.05.009.
- NCCN (2023) Uterine Neoplasms, version 1.