Odhalenie genetickej podstaty nádorového ochorenia prostredníctvom komplexného genomického profilovania a analýzou HRD. Výsledky pilotnej štúdie.

Odpovedá: RNDr. Jana Verebová, PhD.;
Manažér laboratória lekárskej genetiky Košice – Unilabs Slovensko

Nové prístrojové vybavenie nám umožnilo rozšíriť množstvo ponúkaných analýz v oblasti onkogenetiky. Stále sa snažíme zavádzať najmodernejšie genetické postupy v rámci PCR diagnostiky, MLPA a sekvenovania a rozširovať tak naše portfólio o ďalšie vyšetrenia vychádzajúce z požiadaviek našich klientov, ako aj z najnovších výskumných poznatkov a klinických štúdií.

CGP deteguje známe, ale aj nové varianty, vrátane štyroch hlavných tried genomických alterácií a to v rámci rozsiahleho súboru génov spojených so vznikom a vývojom malignít.

Predstavili by ste nám prosím, čomu sa laboratórium Unilabs Košice venuje?

Laboratórium lekárskej genetiky Košice (LLG) sa už vyše 10 rokov venuje diagnostike dedičných nádorových syndrómov a od roku 2015 sa portfólio vyšetrení v rámci molekulárnej patológie rozšírilo aj o analýzu somatických mutácií v rôznych typoch nádorov. Počas tohto obdobia laboratórium prešlo postupnou premenou. Rozrástlo sa priestorovo, pribudlo inovatívne prístrojové a softvérové vybavenie a implementovali sa nové molekulárne metódy, predovšetkým sekvenovanie novej generácie (NGS – „next-generation sequencing“). Naše najnovšie vyšetrenia reflektujú aj súčasný trend personalizovanej medicíny v onkológii.

Aký je Váš pohľad na využitie komplexných NGS metodík ako je komplexné genomické profilovanie nádorov v diagnostike onkologických ochorení?

Genómové technológie umožnili analýzu rôznych typov variantov z tej istej vzorky nádoru pomocou sekvenovania novej generácie (NGS), zároveň umožnili aj detekciu nových imuno-onkologických markerov. Tieto veľké génové panely založené na NGS poskytujú komplexné genomické profilovanie (CGP) vzorky nádorového tkaniva alebo tekutej biopsie.

Ide o substitúcie báz – teda jednonukleotidových variantov, inzercie a delécie, alterácie počtu kópií, genové fúzie a zostrihové RNA varianty. Komplexné genómové profilovanie stanovuje zároveň nádorovú mutačnú nálož (TMB) a mikrosatelitovú nestabilitu (MSI). Identifikácia stavu HRD ako súčasť CGP vzhľadom na rastúci význam tohto biomarkera pri onkologickej diagnostike a výbere liečby je veľkým prínosom. Takéto testovanie minimalizuje množstvo potrebného materiálu, ktorý sa nespotrebováva na monogénové testovanie, maximalizuje sa schopnosť identifikovať významné genomické zmeny a skracuje sa celkový čas vyšetrovacieho procesu, čo možno využiť na zlepšenie manažmentu onkologického pacienta.

Z doterajších štúdií je známe, že deficit homológnej rekombinácie je prítomný v približne 48 % karcinómov ovárií. Taktiež pri triple-negatívnom karcinóme prsníka má približne 15 % pacientov zárodočné mutácie BRCA1/2 a ďalších 40 % nádorov má HRD bez mutácií gBRCA1/2.

Čo je HRD a prečo ste sa rozhodli tento parameter zahrnúť do svojich analýz?

Bunky reagujú na poškodenie DNA spustením viacerých vzájomne prepojených DNA opravných dráh.

Centrálny systém na opravu poškodenia DNA s vysokou presnosťou dvojvláknových zlomov DNA predstavuje HRR. HRD, alebo deficit homológnej rekombinácie, je výsledkom neschopnosti bunky opraviť zlomy dvojvláknovej DNA pomocou cesty homologickej rekombinácie. Schopnosť opraviť poškodenie DNA je nevyhnutná pre udržanie genómovej stability a bunkových funkcií, zabezpečenie chromozomálnej integrity a životaschopnosti buniek. Najznámejšími príčinami HRD sú funkčné mutácie v génoch zapojených do HRR dráhy vrátane BRCA1 , BRCA2 , RAD51C, RAD51D, PALB2, ako aj hypermetylácia promótora BRCA1. Ak je dráha HRR narušená, dvojvláknové zlomy sa buď neopravia, alebo sa uplatňuje k chybám náchylný opravný proces nehomológneho spájania voľných koncov (NHEJ). Neopravené alebo nepresne opravené dvojvláknové zlomy vedú v priebehu času k akumulácii genómových aberácií. Tie sa následne prejavujú ako genómová nestabilita, ktorá riadi karcinogenézu a progresiu ochorenia.

Pre pilotnú štúdiu HRD sme sa rozhodli kvôli príležitosti identifikovať väčšie skupiny onkologických pacientiek, ktoré by mohli mať prospech z liečby inhibítormi PARP (PARPi). Zároveň poznanie stavu HRD je nevyhnutné pri manažmente pacientiek s karcinómom ovária.

Pri pokročilom karcinóme prostaty má 10 % – 12 % pacientov zárodočnú alebo somatickú inaktivačnú mutáciu BRCA2 a až 25 % má defekt opravy poškodenia DNA.

Súčasné smernice ESMO odporúčajú zvážiť k identifikácii pacientiek profitujúcich z PARPi testovanie HRD.

Čo je výsledkom analýzy HRD a ako môže tento parameter ovplyvniť ďalší postup terapie?

HRD testy, obsahujú väčšinou dve zložky: status genomickej instability (GIS), ktorý je hodnotený na základe kvantifikácie veľkých genómových prestavieb LST (large scale transitions), straty heterozygozity LOH (loss of heterozygosity) a subchromozomálnych telomerických alelických imbalancií TAI (telomeric allelic imbalance). Tieto parametre vyžadujú pokrytie tzv. pangenómovými SNP sondami. Pre stanovenie pozitívneho alebo negatívneho výsledku sa následne použije validovaný, experimentálne overený cut off. Druhou zložkou je hodnotenie prítomnosti kauzálnych variantov génov BRCA1 a BRCA2 resp. iných HRR génov. Kombinácia týchto výsledkov tvorí celkovú interpretáciu – pozitívny stav HRD je definovaný buď prítomnosťou patogénneho/pravdepodobne patogénneho variantu v génoch BRCA1/2 alebo iných génoch HRR dráhy, a/alebo pozitívnym statusom genomickej instability, GIS tzn. že aj pacientky bez mutácie BRCA môžu byť HRD+.

Podľa NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Version 1.2022 sa u novo diagnostikovaných pacientiek s ovariálnym karcinómom odporúča somatické testovanie k identifikácii molekulárnych zmien vrátane BRCA1/2, LOH či HRD v prípade nedokázanej germinálnej BRCA mutácie. U pacientiek s recidivujúcim ochorením sa odporúča komplexnejšia molekulárna analýza nádoru- vrátane HRD z dôvodu identifikácie potenciálneho benefitu dostupnej cielenej terapie.

Aký typ vzoriek ste testovali v pilotnej štúdii na HRD a aké výsledky ste dosiahli?

Do pilotnej štúdie boli zaradené vzorky pacientiek s high-grade ovariálnym karcinómom, ktoré boli BRCA1 a BRCA2 Wild type. Keďže ide pilotnú štúdiu, doposiaľ sme vyšetrili 16 vzoriek. Vstupným materiálom pre testovanie bolo FFPE tkanivo a následne extrahovaná DNA alebo DNA a RNA z rovnakej vzorky. Vzorky boli analyzované s použitím komerčného kitu TruSight Oncology 500 + HRD, ktorý umožňuje komplexné genomické profilovanie nádoru. Analyzuje 523 génov (DNA časť) a 55 génov (RNA časť) s cieľom identifikovať klinicky významné genomické zmeny v širokom spektre nádorových ochorení, vrátane testovania HRD. Status genomickej instability (GIS), sa hodnotil s využitím softvéru Dragen TruSight Oncology 500, pre vzorky DNA. Podľa prvotných výsledkov v 37,5 % vzoriek s high-grade ovariálnym karcinómom, ktoré boli BRCA1/2 wild type sme detegovali – pozitívny stav HRD na základe skóre genomickej instability (≥42).

Zároveň kombinácia testovania HRD s komplexným genomickým profilovaním (CGP) môže poskytnúť detailný obraz nádoru a ponúknuť rozšírené možností personalizovanej liečby.

Ako ovplyvní zavedenie tohto riešenia chod Vášho laboratóriá?

Tento test je riešenie pre komplexné genomické profilovanie s hodnotením HRD v štandardnej laboratórnej prevádzke. Ponúka komplexný a efektívny pracovný postup, od vstupu vzorky až po záverečnú správu. Pre maximálnu účinnosť je test HRD optimalizovaný tak, aby fungoval so štandardným testom TruSight Oncology 500. Využívame rovnaké prístrojové vybavenie NextSeq550 Dx (Illumina) a aj reagencie, ktoré sú doplnené iba o oligá špecifické pre HRD. Proces implementácie testu TruSight Oncology 500 + HRD bol pre nás užívateľsky veľmi jednoduchý, keďže pracovný protokol pre TSO500 sme mali zavedený v našom laboratóriu už skôr i vďaka podpore spoločnosti GeneTiCA.

Aké sú Vaše ďalšie ciele v diagnostike onkologických vzoriek?

Testovanie deficiencie homológnej rekombinácie môže pomôcť identifikovať novú skupinu pacientiek s ovariálnym karcinómom (HRD pozitívne/BRCA wt), ktoré by mohli mať profit z liečby PARPi. Chceli by sme preto pokračovať v pilotnej štúdii zameranej na HRD testovanie a následne ponúkať toto vyšetrenie pre našich klientov. Zároveň kombinácia testovania HRD s komplexným genomickým profilovaním (CGP) môže poskytnúť detailný obraz nádoru a ponúknuť rozšírené možností personalizovanej liečby.

Ďakujeme za rozhovor.

RNDr. Jana Verebová, PhD.
Manažér laboratória lekárskej genetiky
Unilabs Slovensko, Gorkého 8, 040 01 Košice
jana.verebova@unilabs.com

GeneTiCA

Božena Bollová
Regionálna manažérka
+421 917 334 151
bollova@genetica-group.com

Monika Szentiványi
Obchodná manažérka
+421 908 708 999
szentivanyi@genetica-group.com

GeneTiCA Group je Váš spoľahlivý partner
pre genomické testovanie pomocou NGS v onkológii.