

VLOGA MOLEKULARNE DIAGNOSTIKE PRI RAKU JAJČNIKOV

.. ..

*Vida Stegel in Srdjan Novaković
Oddelek za molekularno diagnostiko OIL*

NAJPOGOSTEJE SPREMENJENI (MUTIRANI) GENI PRI RAZLIČNIH PODTIPIH EPITELIJSKEGA RAKA JAJČNIKOV

Epitelijski rak jajčnikov (podtipi)	Najpogosteje spremenjeni geni
serozni karcinom visokega gradusa (70–80 %)	TP53 (>90 %), BRCA1, BRCA2, CDK12, RB1, NF1 RAD51C/D, BRIP1, ATM, ATR, CHEK2, HR geni EMSY, CCNE1 amplifikacija NOTCH in FOXM1 signalni poti
serozni karcinom nizkega gradusa (5 %)	KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, ERBB2 (30–50%) Mutacije se med seboj izključujejo
endometrioidni karcinom (10 %)	ARID1A (30%), CTNNB1, PTEN (20%), PIK3CA (30%) MSI (12.5–19%), okvara MMR genov
svetlocelični karcinom (5–10 %)	ARID1A (46–57%), PIK3CA (36–46%), KRAS (7%), CTNNB1 (3%), PTEN (10%), BRAF (1%), PP2R1A LOH PTEN (chr10q23) TP53 (15%) okvara MMR genov
mucinozni karcinom (3–5 %)	KRAS (60–75%) – kodon 12, ERBB2-amplifikacija(20%) mutacije v genih MUC2, MUC3, MUC17

Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, Y. R. (2014) 'WHO Classification of tumors', in Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, Y. R. (ed.). IARC Press.

Novaković S.(2020). Molekularnobiološke značilnosti ginekoloških rakov in raka dojk. v Takač I (eds.) Ginekološka onkologija, , Univerza v MB, Univerzitetna založba

Hollis RL and Gourly C, Cancer Biol Med 2016

MOLEKULARNO GENETSKE PREISKAVE PRI RAKU JAJČNIKOV

Za namen zdravljenja:

Genotipizacija genov BRCA1 (23 eksonov) in BRCA2 (27 eksonov)

V genih BRCA ni ponavljajočih se t.i. “hot spot” mutacij

Patogene različice (mutacije) so različne:

- ▶ Male 1-nekaj nukleotidne spremembe (SNV, male delecije/insercije)
- ▶ Večje delecije (celotnih eksonov ali celega gena)

Genotipizacija drugih genov vpletenih v homologno rekombinacijo

Določanje mikrosatelitne nestabilnosti (MSI-PCR)

Genotipizacija genov vpletenih v popravljalne mehanizme neujemanja baz (MMR geni)

ZARODNE IN SPORADIČNE NUKLEOTIDNE RAZLIČICE

- ▶ **Zarodne različice** (so dedne - se prenašajo na potomce) – so prisotne v vseh celicah telesa od rojstva dalje (tudi v tumorju)
- ▶ **Sporadične različice** (nastanejo tekom razvoja organizma) – so prisotne le v določenih celicah organizma:
 - ▶ Prisotne v obsežnejšem delu tkiva (somatski mozaicizem – pr. FAP)- se prenesejo naprej le, če je sprememba prisotna tudi v celicah iz katerih nastajajo spolne celice.
 - ▶ Prisotne zgolj v tumorju (omejena prisotnost različice)

MOLEKULARNO GENETSKE PREISKAVE PRI RAKU JAJČNIKOV

Genotipizacija genov, kjer ni ponavljajočih se t.i. “hot spot” mutacij.

Sekvenciranje celotnih genov.

Mutacije (patogene različice) pričakujemo v genih z večjim številom eksonov.

Sekvenciranje druge generacije (NGS) – ki omogoča paralelno sekvenciranje večjega števila fragmenov hkrati

METODE DOLOČANJA ZARODNIH IN SPORADIČNIH NUKLEOTIDNIH RAZLIČIC

► Določanje zarodnih sprememb

► Izhodni material:

- kri,
- drugo netumorsko tkivo

► Metode:

detekcija različic z alelno frekveco okrog 50%

- NGS (sekvenciranje druge generacije): kit *TruSightCancer* ali *TruSightHereditary*
- sekvenciranje po Sangerju,
- MLPA (metoda za določanje večjih delecij)

► Genotipizacija tumorjev

► Izhodni material:

- Primarni tumor (FFPE)
- zasevek (FFPE, ascites)

► Metode:

detekcija različic z alelno frekveco nad 5% (SNV) oz nad 10% male indel, slabše zaznavanje večjih znotrajgenskih delecij

- NGS (sekvenciranje druge generacije): kit *TruSightTumor 170* ali *TruSightOncology 500*

TARČNO PREGLEDANI PANELI GENOV

- ▶ Določanje zarodnih sprememb v genih povezanih s sindromom dednega raka dojk in/ali jajčnikov:
- ▶ TruSightCancer ali TruSight Hereditary (reagent):
 - ▶ Geni vpleteni v homologno rekombinacijo (HR): ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK2, PALB2, RAD51C, RAD51D,
 - ▶ Geni vpleteni v “mismatch repair” (MMR): EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2,
 - ▶ Drugi sindromi dednih rakov: NF1, PTEN, STK11, CDH1, TP53.

- ▶ Določanje klinično pomembni različic v tumorjih epiteljskih rakov jajčnikov:
- ▶ TruSight Tumor 170:
 - ▶ ATR, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BAP1, BLM, CDK12, CHEK1, CHEK2, ERCC1, MRE11, NBN, PALB2, RAD51B, RAD51C, RAD51D, SLX4,
 - ▶ MLH1, MSH2, MSH6, PMS2,
 - ▶ CDH1, NF1, PTEN, STK11, TP53,
 - ▶ AKT1, ARID1A, BRAF, KRAS, NOTCH3, FOXL2,
- ▶ TruSight Oncology 500:
 - ▶ ATR, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BAP1, BLM, CDK12, CHEK1, CHEK2, ERCC1, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, MRE11, NBN, PALB2, RAD51B, RAD51C, RAD51D, SLX4
 - ▶ MLH1, MSH2, MSH6, PMS2,
 - ▶ CDH1, NF1, PTEN, STK11, TP53,
 - ▶ AKT1, ARID1A, BRAF, KRAS, NOTCH3, FOXL2,

REZULTATI TESTIRANJ TUMORJEV JAJČNIKOV

Neselekcionirani tumorji jajčnikov (večina HGS, LGS, EC, CC):

- ▶ BRCA1 ali BRCA2 – cca 22%
- ▶ TP53
- ▶ KRAS
- ▶ NRAS
- ▶ BRAF
- ▶ NF1
- ▶ ARID1A
- ▶ ERBB2
- ▶ NOTCH3
- ▶ Drugi HR geni

UPORABNA VREDNOST NUKLEOTIDNIH RAZLIČIC ZA OBRAVNAVO BOLNIKA

Nukleotidna različica \neq klinično pomembna različica za določeno (preiskovano) vrsto raka

Zarodne klinično pomembne različice (patogene in verjeno patogene različice):

- nosilci teh različic so bolj ogroženi, da zbolijo za rakom
- različica je napovedni dejavnik odgovora na zdravljenje

Klinično pomembne različice detektirane v tumorskem tkivu

- napovedni dejavnik odgovora na zdravljenje
- prognostični dejavnik
- diagnostični dejavnik
- potencialno zarodne različice – pomembne za zgodnje odkrivanje raka

KATERE RAZLIČICE POROČAMO NA IZVIDU?

• ..

Smernice:

- ▶ NCCN smernice
- ▶ ESMO smernice
- ▶ Članki

Preverjanje kliničnega pomena različic v bazah podatkov:

- ▶ OnkoKB
- ▶ MetaKB
- ▶ ClinicalTrials
- ▶ HGMD
- ▶ ClinVar
- ▶ In druge baze podatkov

KLASIFIKACIJA RAZLIČIC GLEDE NA NJIHOV KLINIČNI POMEN

SMERNICE ZA KLASIFIKACIJO ZARODNIH RAZLIČIC

© American College of Medical Genetics and Genomics

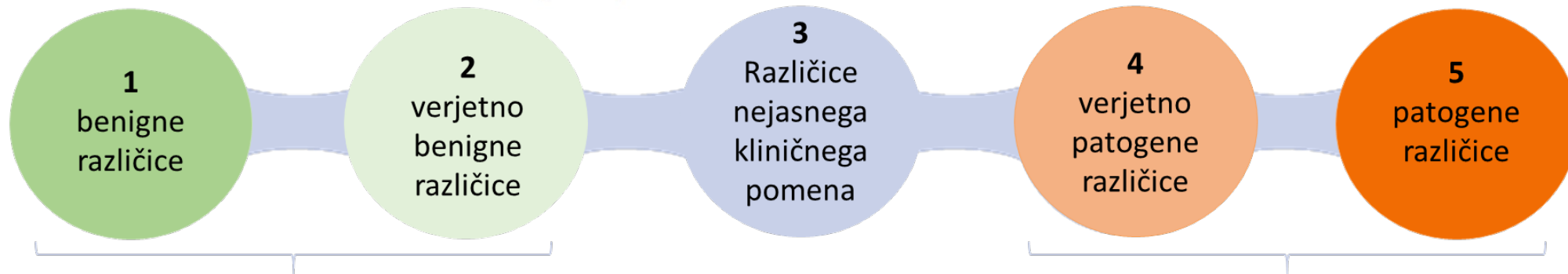
ACMG STANDARDS AND GUIDELINES

Genetics
in Medicine

Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

Sue Richards, PhD¹, Nazneen Aziz, PhD^{2,16}, Sherri Bale, PhD³, David Bick, MD⁴, Soma Das, PhD⁵, Julie Gastier-Foster, PhD^{6,7,8}, Wayne W. Grody, MD, PhD^{9,10,11}, Madhuri Hegde, PhD¹², Elaine Lyon, PhD¹³, Elaine Spector, PhD¹⁴, Karl Voelkerding, MD¹³ and Heidi L. Rehm, PhD¹⁵; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

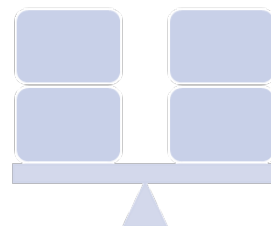
- 5 razredov patogenosti
- Zbiranje dokazov v prid patogenosti ali benignosti



Klinično nepomembne različice:

Benigne in verjetno benigne različice – ne povišajo ogroženosti za nastanek raka

Različice nejasnega kliničnega pomena: Ni dovolj podatkov, da bi jih uvrstili med klinično pomembne ali nepomembne različice.



Klinično pomembne različice:

Patogene in verjetno patogene različice ovzročijo okvaro proteina. Če je ugotovljena klinično pomembna različica se pacientu ponudijo:

- preventivni ukrepi in nadaljnje spremljanje
- tarčno zdravljenje (če je okvarjen gen predpogoj za zdravljenje npr. BRCA1 & PARPi)

IZVID GENOTIPIZACIJE ZARODNIH/DEDNIH SPREMEMB

Diagnoza: Oddelek za onkološko klinično genetiko
 Razlog napotitve: maligna neoplazma dojke, neopredeljena
 Potrditev rezultata 2842/20

Datum odvzema vzorca: 03.05.2021
 Datum prejema vzorca: 03.05.2021
 Vrsta vzorca: kri

Rezultati:

Klinično pomembna različica je dokazana.
 »Klinično pomembna različica« je definirana kot genetska sprememba, ki je povezana s povečano ogroženostjo za nastanek raka.

Gen	Patogena različica	Razred	Interpretacija
BRCA1 (LRG_292t1)	c.5266dupC p.(Gln1756Profs*74)	heterozigot 5	Visoka ogroženost za nastanek rakov povezanih s sindromom dednega raka dojke in jajčnikov. Različica je lahko pomembna za načrtovanje zdravljenja.

Obrazložitev:
 Patogena različica c.5266dupC p.(Gln1756Profs*74) v genu BRCA1 povzroči premik bralnega okvira in nastanek prezgodnjega stop kodona ter posledično nastanek okrnjenega ali spremenjenega proteina. Nosilci patogenih in verjetno patogenih različic (PR/VPR) v genu BRCA1 so bolj ogroženi, da zbolijo za raki, povezanimi s sindromom dednega raka dojke in/ali jajčnikov, kot splošna populacija (NCCN, 2021). Po smernicah NCCN in ESMO so bolniki z rakom jajčnikov, prostate, dojke ali trebušne slinavke ter dokazano PR/VPR v genih BRCA1 ali BRCA2 primerni za zdravljenje z zaviralci PARP proteinov (NCCN, 2020, 2021a, 2021b, 2021c; ESMO, 2020; Mosele et al., 2020). Dokazane PR/VPR v zgoraj navedenih genih so lahko vzrok za okvaro homologne rekombinacije. Svetujemo posvet s specialistom klinične genetike in lečečim onkologom, ki opredeli pomen različice za načrtovanje zdravljenja.

Opombe:
 Svetujemo vam, da se o rezultatu molekularno genetske preiskave in nadaljnjih priporočilih posvetujete s specialistom klinične genetike, ki bo podal dokončno oceno ogroženosti za nastanek raka. Rezultat testa je lahko pomemben tudi za vaše sorodnike. Vsi sorodniki preiskovanca/-ke v prvem kolenu imajo 50 % verjetnost, da so nosilci enake zgoraj navedene patogene različice. Svetujemo jim posvet s specialistom klinične genetike. Obrazložitev različic po razredih je podana na hrbtni strani izvida.

Analizo izvedel: Izvid avtoriziral: Vodja Oddelka za molekularno diagnostiko:

Različica je pomembna za načrtovanje zdravljenja

POZOR!

Različice navedene pod dodatnimi ugotovitvami NIMAJO pomena za načrtovanje zdravljenja

Diagnoza: Ambulanta za genetsko svetovanje OIL
 Razlog napotitve: maligna neoplazma zgornjega-zunanjega kvadranta dojke pozitivna družinska anamneza za sindrom dednega raka dojke in/ali jajčnikov, osebna anamneza za sindrom dednega raka dojke in/ali jajčnikov

Prejeto iz: Oddelek za laboratorijsko dejavnost, OIL
 Datum odvzema vzorca: 04.03.2014
 Datum prejema vzorca: 04.03.2014 13:10:00
 Vrsta vzorca: kri
 Vzorec odvzet iz: iz odvzema 212/14

Rezultati:

Klinično pomembna različica ni dokazana.
 »Klinično pomembna različica« je definirana kot genetska sprememba, ki je povezana s povečano ogroženostjo za nastanek raka.

Obrazložitev:
 V preiskovanih genih so lahko prisotne genske spremembe, ki jih zaradi omejitev uporabljenih metod ni možno zaznati. Klinično pomembne različice so lahko prisotne tudi v drugih genih, ki niso bili preiskovani.

Dodatne ugotovitve:

Gen	Različica	Razred	Interpretacija
BRCA1 (LRG_292t1)	c.-86C>T p.?	heterozigot 3	Neznan vpliv na ogroženost za nastanek raka.
BRCA2 (LRG_293t1)	c.9976A>T p.(Lys3326*)	heterozigot 3	Neznan vpliv na ogroženost za nastanek raka.
PALB2 (LRG_308t1)	c.1597A>G p.(Thr533Ala)	heterozigot 3	Neznan vpliv na ogroženost za nastanek raka.
STK11 (LRG_319t1)	c.918C>T p.(His306=)	heterozigot 3	Neznan vpliv na ogroženost za nastanek raka.

Opombe:
 Svetujemo vam, da se o rezultatu molekularno genetske preiskave in nadaljnjih priporočilih posvetujete s specialistom klinične genetike. Rezultat testa je lahko pomemben tudi za vaše sorodnike. Obrazložitev različic po razredih je podana na hrbtni strani izvida.

Analizo izvedel: Izvid avtoriziral: Vodja Oddelka za molekularno diagnostiko:

NAPOTITEV NA GENOTIPIZACIJO ZARODNIH MUTACIJ

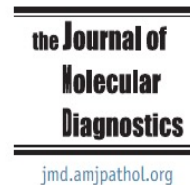
• •

- Preko napotitve na genetsko svetovanje:
 - Klinična pot genetske obravnave bolnic z epitelijskim nemucinoznim rakom jajčnikov/jajcevodov/primarnim peritonealnim seroznim karcinomom

KLASIFIKACIJA RAZLIČIC GLEDE NA NJIHOV KLINIČNI POMEN SMERNICE ZA KLASIFIKACIJO RAZLIČIC (GENOTIPIZACIJA TUMORJEV)

- NAMEN
- Omogočiti razlikovanje med najdbami, ki so dokazano klinično pomembne, najdbami z možnim kliničnim pomenom in najdbami, ki so brez znanega kliničnega pomena.

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 19, No. 1, January 2017



SPECIAL ARTICLE

Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer



A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists



Annals of Oncology 29, 1855–1902, 2018
doi:10.1093/annonc/mdy263
Published online 21 August 2018

SPECIAL ARTICLE

A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT)

J. Mateo¹, D. Chakravarty², R. Dienstmann¹, S. Jezdic³, A. Gonzalez-Perez⁴, N. Lopez-Bigas^{4,5}, C. K. Y. Ng⁶, P. L. Bedard⁷, G. Tortora^{8,9}, J.-Y. Douillard³, E. M. Van Allen¹⁰, N. Schultz², C. Swanton¹¹, F. André^{12*} & L. Pusztai¹³

¹Vall d'Hebron Institute of Oncology (IHO), Barcelona, Spain; ²Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA; ³European Society for Medical Oncology, Lugano, Switzerland; ⁴Institute for Research in Biomedicine (IRB), Barcelona; ⁵Instituto Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain; ⁶University Hospital Basel, Basel, Switzerland; ⁷Princess Margaret Cancer Centre, Toronto, ON, Canada; ⁸University of Verona, Verona; ⁹Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, IRCCS, Rome, Italy; ¹⁰Harvard Medical School Dana-Farber Cancer Center and Broad Institute, Boston, USA; ¹¹The Francis Crick Institute, London, UK; ¹²Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ¹³Yale Cancer Center, New Haven, USA



različica/biomarker, ki napove odziv ali rezistenco na zdravilo

diagnostični /prognistični biomarkerji

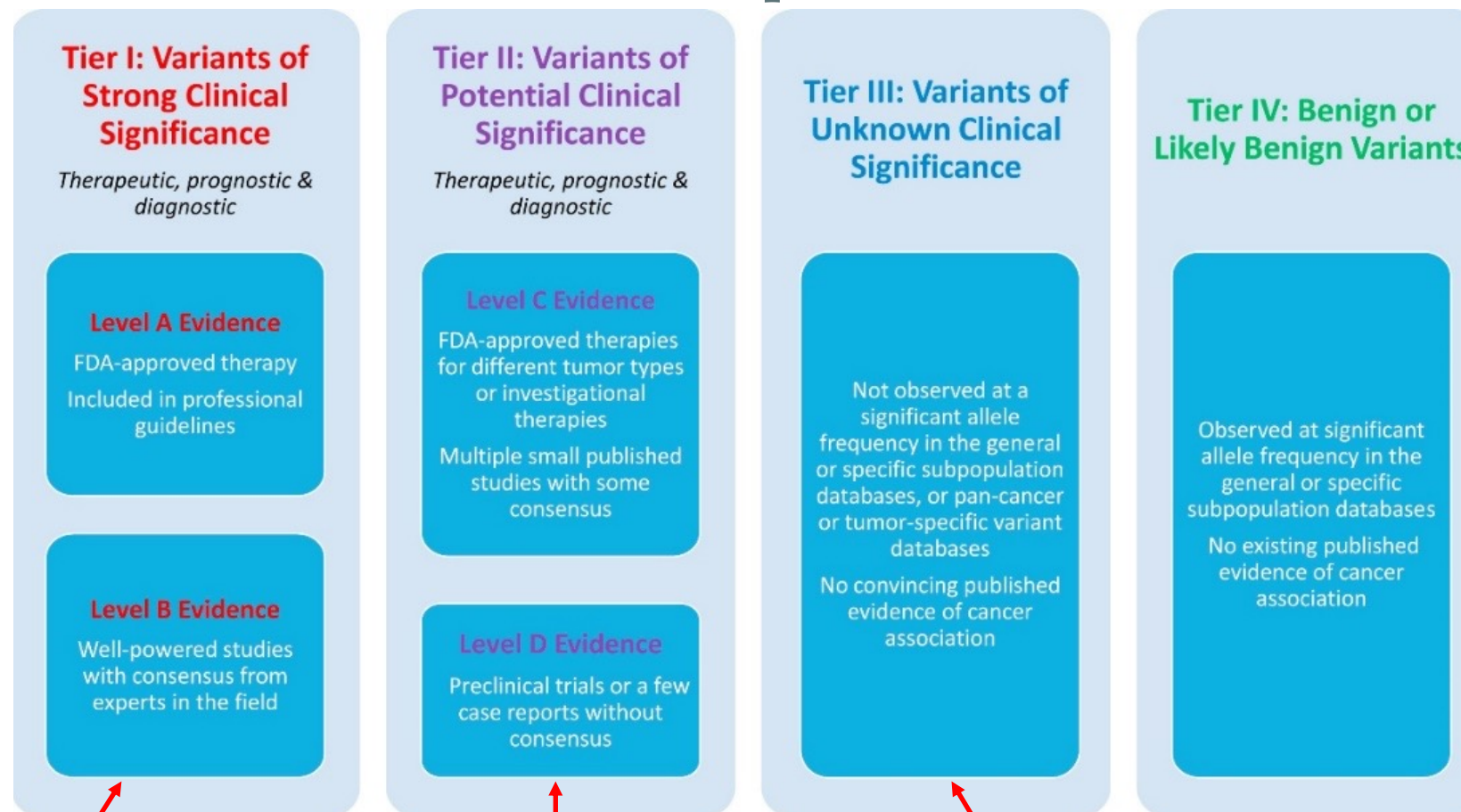
potencialno zarodne različice povezane z dednimi sindromi

različica/biomarker, ki napove odziv na zdravilo

različica/biomarker, ki napove odziv ali rezistenco na zdravilo

JOINT CONSENSUS RECOMMENDATION BY AMP, ASCO AND CAP

Različice, ki imajo vpliv na izbiro zdravljenja, prognostični ali diagnostični pomen



Različica/biomarker, ki napove odziv ali rezistenco na EMA /FDA ali v strokovnih smernicah odobreno zdravilo pri preiskovanem tipu raka

diagnostično/prognostično pomemben biomarker opisan v smernicah

Različica/biomarker, ki napove odziv ali rezistenco na FDA, EMEA, NCCN odobreno zdravilo za drugo lokalizacijo tumorja, vključevanje v klinične študije faze 2 in 3.

Različice z neznanim kliničnim pomenom



NAPOTNICA ZA MOLEKULARNO GENETSKO PREISKAVO – GENOZIPIZACIJA SOMATSKIH MUTACIJ IZ TUMORSKEGA TKIVA

PODATKI O BOLNIKU

Priimek in ime: _____ (nalepka)	Klinična diagnoza: _____
Datum rojstva: _____	Razlog napotitve: _____
Št. popisa: _____	Prednostna obravnava: _____
KZZ/št.kartice _____	<input type="checkbox"/> da
Spol: <input type="checkbox"/> ženski <input type="checkbox"/> moški	Datum napotnice: _____

PODATKI O VZORCU

ČE MATERIAL NI SHARNJEN NA OIL, NAPOTNICI PRILOŽITI KOPIJU HISTOPATOLOŠKEGA IZVIDAI

Vrsta vzorca:	Vzorec odvzet iz (lokalizacija):	Št. biopsije:	Delež tumorskih/ spremenjenih celic v vzorcu:	Datum odvzema vzorca:	Ustanova, kjer je shranjen vzorec:
<input type="checkbox"/> parafinski blok	<input type="checkbox"/> primarni tumor:	_____	_____	_____	_____
<input type="checkbox"/> aspiracijska	<input type="checkbox"/> zasevek:	_____	_____	_____	_____
<input type="checkbox"/> punktat kostnega	<input type="checkbox"/> netumorsko tkivo:	_____	_____	_____	_____
<input type="checkbox"/> kri					
<input type="checkbox"/> druga:					

ZAHTEVANE PREISKAVE

DOLOČANJE GENOTIPOV

Rak debelega črevesa in danke <input type="checkbox"/> KRAS <input type="checkbox"/> BRAF <input type="checkbox"/> NRAS <input type="checkbox"/> HER2 <input type="checkbox"/> druga: _____	Maligni melanom <input type="checkbox"/> BRAF <input type="checkbox"/> NRAS <input type="checkbox"/> KIT <input type="checkbox"/> druga: _____	GIST <input type="checkbox"/> KIT <input type="checkbox"/> PDGFRA <input type="checkbox"/> BRAF <input type="checkbox"/> druga: _____	Rak dojke <input type="checkbox"/> PIK3CA <input type="checkbox"/> BRCA1 <input type="checkbox"/> BRCA2 <input type="checkbox"/> druga: _____	Rak jajčnikov in PPSC <input type="checkbox"/> BRCA1 <input type="checkbox"/> BRCA2 <input type="checkbox"/> druga: _____	Rak trebušne slinavke <input type="checkbox"/> BRCA1 <input type="checkbox"/> BRCA2 <input type="checkbox"/> druga: _____	Druge neoplazme <input type="checkbox"/> Sarkom in druge mehkativne tvorbe <input type="checkbox"/> Rak materničnega telesa <input type="checkbox"/> Rak prostate <input type="checkbox"/> Rak ledvic, nadl. žleze, neuroendok. tum. <input type="checkbox"/> Rak ščitnice <input type="checkbox"/> Maligne novotvorbe- neznane izvora
---	---	--	--	---	---	---

Napotni zdravnik (ime, šifra, ustanova, telefon): _____

Podpis napotnega zdravnika (štempiljka): _____

Datum prejema napotnice: _____

Datum prejema materiala: _____

IZPOLNI ODDELEK ZA MOLEKULARNO DIAGNOSTIKO

Prejel: _____

Prejel: _____

OPOZORILO: Dokumenti so obvladovani elektronsko. Veljavnost dokumenta preverite v aplikaciji GovernmentConnect. Samo za interno uporabo.

IZPOLNI NAPOTNI ZDRAVNIK

Podatki o bolniku

Klinična diagnoza bolnika zaradi katere je napoten na molekularno genetsko preiskavo

Podatki o testiranem tkivu:

- Vrsta vzorca in lokalizacija
- Številka biopsije
- Datum odvzema vzorca
- Ustanova, kjer je vzorec shranjen

Ime in priimek napotnega zdravnika, ustanove in oddelka

Delovni nalog –ZZZS

V primeru, da je napotni zdravnik izven OIL

IZVID GENOTIPIZACIJE TUMORJEV JAJČNIKOV

IZVID GENOTIPIZACIJE SOMATSKIH MUTACIJ IZ TUMORSKEGA TKIVA

Priimek in ime: _____ **Identifikacijska št. izvida:** _____
Datum rojstva: _____ **Datum izvida:** _____
Št. popisa: _____
Spol: ženski

Podatki o napotitvi na preiskavo
Datum prejema napotitve: _____
Napotni zdravnik: _____
Diagnoza: maligna neoplazma jajčnika (ovarja)
Razlog napotitve: uvedba zdravljenja

Preiskovani material
Laboratorijska št. vzorca: _____
Prejeto iz: _____
Datum odvzema vzorca: _____
Datum prejema vzorca: _____
Vrsta vzorca: _____
Vzorec odvzet iz: _____
Številka blapsje: _____
Prisotnost tumorskih celic: 50 % v testiranem vzorcu

Pri analizi smo uporabili sledeče metode:
Ekstrakcija nukleinskih kislin: MAGMAX FFPE RNA/DNA ULTRA KIT (Thermo Fisher)
Sekvenciranje NGS: TruSight Oncology 500 DNA kit (Illumina); TSO500-DNA

Rezultati:

KLINIČNO POMEMBNE RAZLIČICE

Gen/Fuzija:	Rezultat:	Različica	AF(%)	Učinkovina	Pričakovan odgovor
BRCA1	različica razreda I	c.1729G>T p.(Glu577*)	47.88	zaviralol PARP	občutljiv - verjetno odgovori na zdravljenje

Različice razreda I so različice z znanim kliničnim pomenom. Različica razreda I c.1729G>T p.(Glu577*) v genu BRCA1 povzroči nastanek prezgodnjega stop kodona ter posledično nastanek okrnjenega ali spremenjenega proteina. Po smernicah NCCN in ESMO so bolniki z rakom jajčnikov, prostate, dojke ali trebušne slinavke ter dokazano klinično pomembno različico v genih BRCA1 ali BRCA2 primerni za zdravljenje z zaviralci PARP proteinov (NCCN, 2020, 2021a, 2021b, 2021c; ESMO, 2020; Mosele et al., 2020). Dokazane klinično pomembne različice v zgoraj navedenih genih so lahko vzrok za okvaro homologne rekombinacije. Z uporabljenimi metodami ni možno ločiti somatskih od zarodnih različic. Zarodne patogene različice v genu BRCA1 so povezane s sindromom dednega raka dojke in/ali jajčnikov. V primeru, da klinična slika ustreza sindromu dednega raka dojke in/ali jajčnikov, je pacienta priporočljivo napotiti na posvet s specialistom klinične genetike.

BRCA2 **nemutiran**

Z genotipizacijo DNA smo dokazali klinično pomembne različice.

DRUGE NAJDBE

Gen/Fuzija:	Rezultat:	Različica	AF(%)
TP53	različica razreda II	c.524G>A p.(Arg175His)	28.42

Različice razreda II so različice z možnim kliničnim pomenom. Različica razreda II c.524G>A p.(Arg175His) v genu TP53 povzroči zamenjavo aminokisliline ter posledično nastanek okrnjenega ali spremenjenega proteina. V tumorju detektirane patogene ali verjetno patogene različice v genu TP53 so pogosto somatskega izvora. Z uporabljenimi metodami ni možno ločiti somatskih od zarodnih različic. Zarodne patogene različice v genu TP53 so povezane s sindromom Li-Fraumeni. V primeru, da klinična slika ustreza sindromu Li-Fraumeni, je pacienta priporočljivo napotiti na posvet s specialistom klinične genetike.

Ooenjen TMB necinonimnih različic, preračunan na eno mega bazo (1Mb), je 4 različic/Mb. Za izračun so upoštewane vse verjetno somatske različice razen globokointronskih in tihih (sinonimnih) različic.
 Ooenjen TMB necinonimnih in sinonimnih različic, preračunan na eno mega bazo (1Mb), je 8 različic/Mb. Za izračun so upoštewane vse verjetno somatske različice razen globokointronskih.

PREISKOVANI GENI

AKT1, ARID1A, ATR, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, NF1, NOTCH3, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, BRAF, KRAS, PDGFRA, FOXL2, TP53, BAP1, BLM, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCF, FANCG, MRE11, ERCC1, SLX4

Analizo izvedel: _____ **Izvid avtoriziral:** _____ **Vodja Oddelka za molekularno diagnostiko:** _____

IZVID GENOTIPIZACIJE SOMATSKIH MUTACIJ IZ TUMORSKEGA TKIVA

Priimek in ime: _____ **Identifikacijska št. izvida:** _____
Datum rojstva: _____ **Datum izvida:** _____
Št. popisa: _____
Spol: ženski

OPIS METOD
 Sekveniranje druge generacije (angl. Next Generation Sequencing, NGS) s kompletom TruSight Oncology 500 – DNA (Illumina) za tarčno sekvenciranje. Pri genotipizaciji zarodnih sprememb je zagotovljena >40x pokritost preiskovanih tarčnih regij, pri genotipizaciji somatskih sprememb pa z 250-kratno pokritost preiskovanih tarčnih regij za z 93,5% tarčnih regij. Na nivoju DNA so sekvencirani geni opisani v Tabeli TruSight Oncology 500 – DNA. Analiza podatkov (prilic nukleotidnih različic), ki so rezultat sekvenciranja knjižnic TruSight Oncology 500, je bila izvedena s programskim orodjem TruSight Oncology 500 Local App v1.3.1 (Illumina).

OMEJITVE METOD
 V preiskovanih genih so lahko prisotne spremembe v regulatornih regijah ali v regijah, ki niso vključene v panel, ki jih ni možno zaznati z uporabljenimi metodami. Prisotnost pseudogenov lahko zakrije detekcijo različic in velikih delecij/insercij v določenih genih. Prisotnost različic na mestih, kjer nalegajo primerji in GC-bogate regije v določenih genih lahko zmanjšajo detekcijo različic v tem genu.

Z metodo NGS je na nivoju DNA možno zaznati enonukleotidne različice (SNV), manjše delecije in insercije. Meja detekcije je 5% mutirane DNA v ozadju nemutirane genomске DNA. Občutljivost in specifičnost metode za zaznavanje SNV in manjših delecij in insercij z vsaj 5% alelo frekvenco v vzorcu sta 95% pri zagotovljeni pokritosti tarčnih regij.

DODATNE OPOMBE

Z uporabljenimi metodami ni možno ločiti somatskih različic od zarodnih različic. Mutacijski status se lahko razlikuje tako znotraj tumorja kot tudi med primarnim tumorjem in zasevikom. Negativen rezultat vzorca, ki vsebuje manj kot 30% tumorskih celic, ne izključuje prisotnosti somatskih mutacij. Glavne informacije o tarčnih regijah so v tabeli Seznam genov pri solidnih tumorjih na spletni strani: https://www.onco.tsl.dejavnosti/zdravstvena_dejavnost/diagnostična_dejavnost/oddelek_za_molekularno_diagnostiko/sporadicne_oblike_raka. Za naleganje in anotacijo je uporabljen referenčni človeški genom hg19. Spremembe so opisane v skladu z nomenklaturo HGVS v20.05. 0 številko 1 je označen 1. nukleotid start kodona ATG cDNA. Pri klasifikaciji različic preverimo baze podatkov OncoKB, MetaKB, gnomAD, Cosmic, ClinVar in druge. Nukleotidne različice so klasificirane v štiri razrede, glede na klinično pomembnost (LI et al., 2017). Na izvidu so navedene različice z znanim kliničnim pomenom (razred I), različice z možnim kliničnim pomenom (razred II) in različice nejasnega kliničnega pomena (VUS, razred III). Verjetno benigne različice in benigne različice (razred IV) niso navedene na izvidu, saj niso klinično pomembne.

Literatura
 LI, M. M. et al. (2017) Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J. The Journal of molecular diagnostics : JMD, 19(1), pp. 4–23. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002.

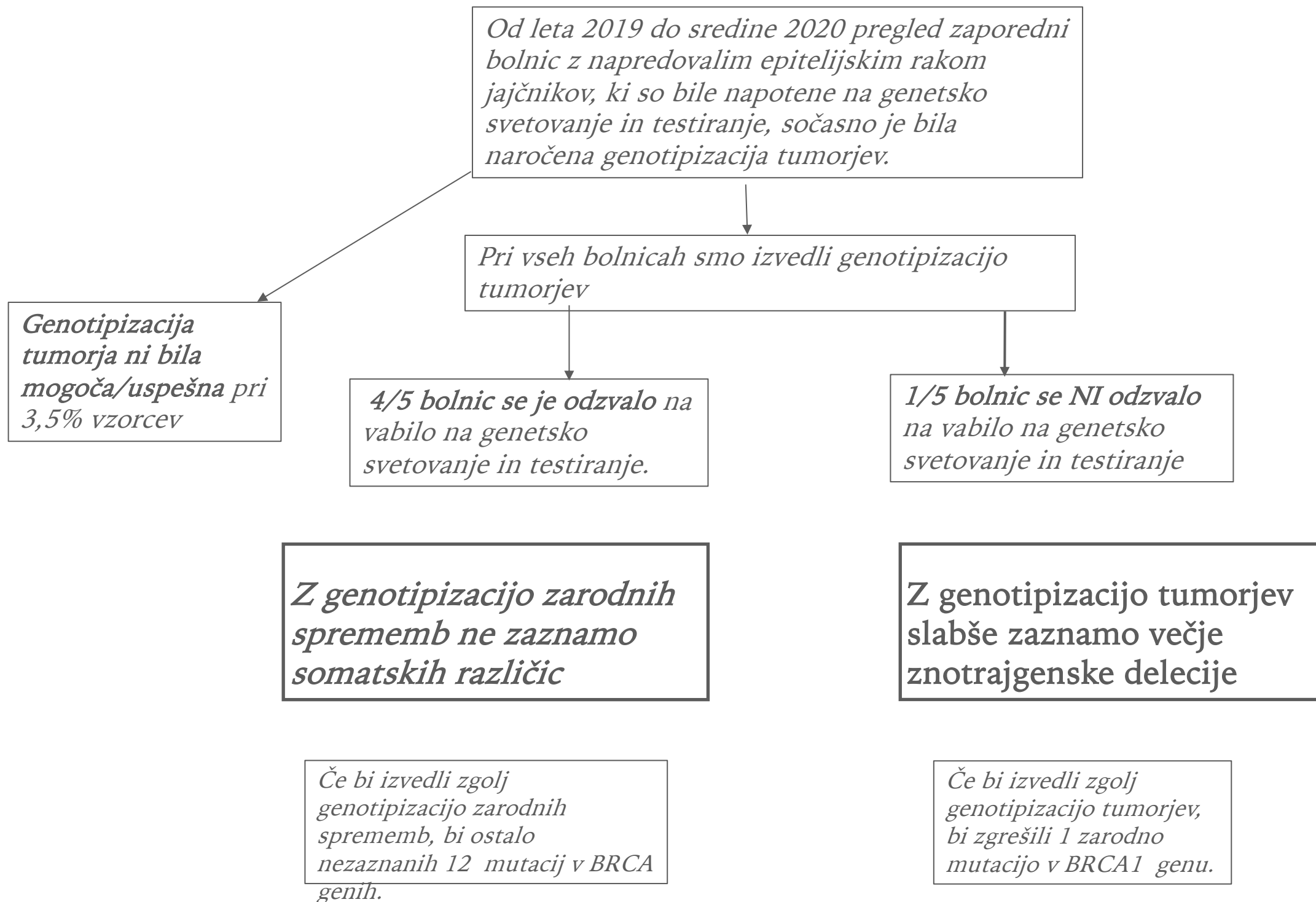
TruSight Oncology 500 - DNA.

GEN	REFERENČNA SEKVENCA GENA	GEN	REFERENČNA SEKVENCA GENA	GEN	REFERENČNA SEKVENCA GENA	GEN	REFERENČNA SEKVENCA GENA	GEN	REFERENČNA SEKVENCA GENA
ABL1	LRG_7591	DIS3	NM_001126226.1	HST11HC	NM_005319.3	MUTYH	LRG_2201	REL	NM_002006.2
ABL2	NM_001136000.2	DNAH1	NM_001145.1	HST11HSD	NM_021063.3	MYB	NM_001130172.1	RET*	LRG_5181
ACVR1B	NM_001106.4	DNMT1	LRG_3621	HST11HSA	NM_002929.2	MYC*	NM_002467.4	RFWO2	NM_001001740.2
ACVR1B	NM_004302.4	DNMT3A	LRG_4581	HST11HBB	NM_002937.3	MYCL1*		RFBP	NM_00614.3
AKT1	LRG_7211	DNMT3B	LRG_5611	HST11HCC	NM_003931.2	MYCN*	NM_006376.4	RHOA	LRG_10691
AKT2*	NM_001626.4	DOT1L	NM_024462.2	HST11HDD	NM_003930.4	MYO8B	LRG_15711	ROCTO*	NM_152796.3
AKT3	NM_006465.4	EP3	NM_001240076.2	HST11HDE	NM_003932.2	MYO11	NM_004476.4	RIT1	NM_001296000.1
AKR*	LRG_4881	EPFR*	NM_003997.3	HST11HDF	NM_021015.2	NAB2	NM_006967.3	RNF43	LRG_10281
ALOX12B	LRG_12581	EPFL7	NM_016215.4	HST11HGG	NM_003934.2	NBN	LRG_15811	ROST	LRG_36711
ANKRD11	NM_001261102.1	EPFR*	LRG_3081	HST11HGH	NM_003936.2	NCOA3	NM_001174067.1	RP59CA4	NM_001006844.1
ANKRD26	LRG_8051	EPITAX	NM_001412.3	HST11HGI	NM_003933.2	NCOA1	NM_001104036.1	RP59CB1*	NM_001272431.1
APC	LRG_1301	EPIC2	NM_001267.3	HST11HJJ	NM_003935.2	NEGR1	NM_173800.2	RP59C2	NM_003952.2
APC*	LRG_2541	EPIC4	NM_001130676.1	HST11HKA	NM_001009464.2	NF1	LRG_2141	RPTOR	NM_001163004.1
ARAF	NM_001261196.1	EMEA	NM_001146076.1	HST11HKB	NM_001009472.2	NF2	LRG_5111	RUNX1	LRG_4621
ARFP1	NM_001134796.2	EP300	NM_001426.3	HST11HKL	NM_001123375.2	NFE2L3	NM_001145412.2	RUNX1T1	NM_001196026.1
ARID1A	LRG_8751	EPCAM	LRG_2191	HST11HLM	NM_004463.2	NFKB2A	LRG_811	RYBP	NM_012234.5
ARID1B	LRG_8611	EPHA3	NM_006233.5	HLA-A	NM_001242796.1	NRG1	NM_001079992.2	SDHA	LRG_3191
ARID2	NM_152941.2	EPHA5	NM_004433.5	HLA-B	NM_009914.6	NRG1	NM_001263339.1	SDHA2	LRG_5191
ARID3B	NM_001244530.1	EPHA7	NM_004443.3	HLA-C	NM_002117.5	NOTCH1	NM_017617.3	SDHB	LRG_3161
ASXL1	LRG_6301	EPHB1	NM_004441.4	HNF1A	LRG_8221	NOTCH2	NM_004403.3	SDHC	LRG_3171
ASXL2	NM_016263.4	EPHB2*	NM_004442.2	HNRNPK	NM_002140.3	NOTCH3	NM_004405.2	SDHD	LRG_311
ATM*	LRG_1361	ERBB3*	LRG_3091	HOUY13	LRG_7711	NOTCH4	NM_004957.3	SETBP1	LRG_11501
ATR	NM_001164.3	ERBB4	NM_006236.2	HRAS	LRG_5091	NPM1	LRG_4691	SETD2	LRG_7751
ATRX	LRG_11501	ERCC1*	NM_202001.2	HSD11B1	NM_000862.2	NRAS*	LRG_921	SPB1	LRG_6241
ATRXA	NM_003600.2	ERCC2*	LRG_4611	HSP90AA1	NM_001017963.2	NRG1*	NM_004406.3	SPB3	LRG_6211
ATRXB	NM_001266934.1	ERCC3	LRG_4621	ICOSLG	NM_015269.4	NRG1	LRG_5121	SPG1A	LRG_1061
AVIN1	NM_003932.3	ERCC4	LRG_4631	IGF1	NM_002167.4	NTRK1	LRG_2611	SH21	NM_018130.2
AVIN2	LRG_2661	ERCC5	LRG_4641	IDH1	NM_005966.2	NTRK2	NM_001001997.1	SLIT2	NM_004757.1
AZL	NM_001270999.1	ERG	NM_00245426.1	IDH2	NM_002156.2	NTRK3	NM_001001962.3	SLX4	LRG_5031
BSM	LRG_12191	ERF1	NM_018346.3	IFNG1	LRG_481	NUP93	NM_001042776.1	SMAD3	NM_001030693.3
BAP1	NM_004696.3	ESR1*	LRG_3521	IGF1	NM_000618.3	NUTM1	NM_175741.1	SMAD3	NM_001148102.1
BARD1	NM_004465.2	ETV1	NM_00114320.1	IGF1R	LRG_12691	PAK1	NM_001129020.1	SMAD3A	LRG_3181
BRCA1	NM_001127243.2	ETV1	NM_001162147.1	IGF2	LRG_102111	PAK3	NM_001129186.1	SMARCA4	LRG_8781
BCL10	LRG_12101	ETV4	NM_001079675.2	INSR	NM_001193221.1	PAK7	NM_002041.3	SMARCB1	LRG_5201

➤ Ne ločimo med somatskimi in zarodnimi spremembami

Pomen napotitve na genetsko svetovanje

GENOTIPIZACIJA ZARODNIH RAZLIČIC VS. GENOTIPIZACIJA TUMORJEV



POVZETEK

- ▶ Genotipizacijo pri bolnicah z rakom jajčnikov izvajamo za določanje zarodnih in somatskih sprememb
- ▶ Določamo spremembe, ki napovedujejo ogroženost za rak jajčnikov (genetsko svetovanje)
- ▶ Določamo spremembe, ki napovedujejo odgovor na zdravljenje
- ▶ Osnovna metoda NGS