

MOLEKULARNA DIAGNOSTIKA RAKA DOJK

Srdjan Novaković, Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za molekularno diagnostiko

Povzetek

Rak je bolezen, ki nastane kot posledica delovanja številnih dejavnikov (genetskih, okoljskih, življenjskega sloga), ki povzročijo maligno spremembo celice. S stališča molekularne biologije in genetike razlikujemo dedne in sporadične oblike raka. Genetske spremembe, ki jih opredeljujemo z metodami molekularne diagnostike, nam lahko služijo za različne namene: 1. oceno tveganja, da oseba zboli za rakom, 2. natančnejšo opredelitev tumorjev, 3. oceno prognoze bolezni, 4. napoved odgovora na zdravljenje, 5. napoved presnavljanja zdravil, 6. spremljanje odgovora na zdravljenje, 7. zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni.

V tem prispevku podajam osnovni pregled uporabe molekularne diagnostike pri raku dojk. Prispevek vključuje molekularno diagnostiko dednih oblik raka in molekularno diagnostiko sporadičnih oblik raka glede na trenutno veljavne mednarodne smernice.

Molekularna diagnostika dednega raka dojk

Dedni rak dojk predstavlja 5–10 % vseh rakov dojk. Za dednim rakom dojk in/ali jajčnikov zbolevajo osebe z različnimi dednimi sindromi – dedni sindrom raka dojk in/ali jajčnikov, Li-Fraumenijev sindrom, Cowdenov sindrom, Peutz-Jeghersov sindrom, sindrom ataksije-telangiektazije, Lynchev sindrom in Muir-Torrejev sindrom. Dedni rak dojk najpogosteje nastane kot posledica zarodnih patogenih in verjetno patogenih različic (mutacij) v genih *BRCA1* in *BRCA2*, redkeje pa kot posledica mutacij v genih *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NF1*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *NBN*, *TP53* in še nekaterih drugih. Kot pri večini dednih oblik raka tudi za dednega raka dojk velja, da osebe zbolijo v povprečju nekaj let prej (običajno pred 50. letom) kot je povprečje zbolevanja v splošni populaciji. Razlog za zgodnejši razvoj raka pri osebah z dednimi oblikami raka je v spremenjenem alelu, podedovanem od enega od staršev. Dedni rak dojk se pogosto pojavi kot rak na obeh dojkah. V družinah, obremenjenih z dednim rakom dojk in/ali jajčnikov, je pogost tudi rak dojk pri moških.

Pri dednih oblikah raka primarno iščemo zarodne mutacije v posameznih genih, ki so dokazano povezane z nastankom raka. S tem odkrivamo nosilce

mutacij, pri katerih obstaja večja verjetnost, da zbolijo za določeno vrsto raka. V zadnjih letih so zarodne mutacije uporabljane tudi kot tarče za tarčna zdravila, tako da je namen testiranja tudi načrtovanje ustreznega zdravljenja. Kot primer navajam zaviralce poli-ADP riboza polimeraze (zaviralci PARP), ki jih je leta 2018 ameriška Uprava za hrano in zdravila (angl. Food and Drug Administration, FDA) odobrila za zdravljenje bolnic z metastatskim rakom dojk in zarodnimi mutacijami v genih *BRCA1/2*.

Testiranje posameznikov, za katere se po domačih in mednarodnih smernicah ugotovi, da obstaja verjetnost, da zbolijo za dedno obliko raka dojk, opravljamo na zdravem oziroma netumorskem tkivu. V ta namen uporabljamo različne molekularno diagnostične metode, kot so verižna reakcija s polimerazo (PCR), kvantitativni PCR v realnem času (Q-PCR), neposredno sekvenciranje po Sangerju in sekvenciranje druge (naslednje) generacije (NGS). NGS je metoda, ki omogoča istočasno testiranje več genov v večjem številu vzorcev, kar predstavlja veliko prednost glede na druge metode sekvenciranja. Poleg prednosti, ki jih je prinesla tehnologija NGS, so se z uporabo te tehnologije odprla tudi številna vprašanja glede upravičenosti do testiranja (koga je smiselno testirati), kot tudi glede najustreznejšega panela genov za testiranje. Pri uporabi večgenskih panelov pridobimo številne informacije o različicah v genih, za katere ne poznamo natančne povezave z dednimi oblikami raka. Poseben izziv pri interpretaciji rezultatov NGS predstavljajo različice z neznanim pomenom (VUS) v genih, ki so sicer dokazano povezani z dednimi oblikami raka. Različice z neznanim pomenom so namreč lahko problematične pri interpretaciji tako za zdravnika, ki se odloča o nadaljnjem poteku dela s testirano osebo, kot tudi za samo testirano osebo.

Molekularno genetsko testiranje tumorjev

Za sporadične oblike raka dojk velja, da so zaradi pogostnosti dokaj dobro raziskana vrsta raka. Med pogoste spremembe v genetskem materialu pri raku dojk sodijo relativne kvantitativne spremembe v kromosomskem materialu rakastih celic (aneuploidija) glede na normalne diploidne celice. Te spremembe zajemajo vse kromosome. Geni, ki so pri sporadičnem raku dojk najpogosteje mutirani, so *TP53*, *PIK3CA*, *ERBB2*, *MYC*, *CCND1*, *PTEN*, *ZNF703/FGFR1*, *RB1* in *MAP3K1*. Preureditve, katerih posledica je spremenjen protein, so pogoste v genih *CDKN2A*, *RB1*, *MAP3K1*, *MAP2K4*, *ARID1B*, *FBXW7*, *MLL1* in *TP53*. Tako pri dednih kot pri sporadičnih oblikah raka dojk so za razvoj tumorja pomembne mutacije v genih, ki kodirajo proteine, sodelujoče pri popravljanju dvojnoverižnih prelomov DNA. Poleg genov *BRCA1* in *BRCA2* sodijo v to skupino še geni *ATM*, *ATR*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD50*, *TP53* in *BRIP1*.

Molekularno genetsko testiranje tumorjev izvajamo predvsem z metodami NGS, ki vključujejo velike genske panele. Število vključenih genov v teh panelih se giblje od nekaj deset do nekaj sto genov. V tem trenutku sta najpogosteje uporabljeni platformi NGS, ki ju ponujata Illumina in Thermo Fisher. Glede na relativno ozek nabor klinično pomembnih genetskih označevalcev pri raku dojk pa večino genotipizacij opravimo s kvantitativnim PCR v realnem času. Manjše število tumorjev testiramo tudi z NGS.

Po dosedanjih podatkih se genetske spremembe v primarnih tumorjih raka dojk malo razlikujejo od sprememb v metastazah ali pri ponovnem progresu bolezni. Kljub temu je priporočljivo, da se za molekularno genetsko testiranje uporabijo biopsije, odvzete iz ponovitev ali napredovalih tumorjev. Pogoste genetske spremembe pri raku dojk vključujejo mutacije v genu, ki nosi zapis za estrogenski receptor (*ESR1*). Le-te so lahko neposredno odgovorne za neodzivnost na zdravljenje z zaviralci aromataz pri ER+ napredovalem raku dojk. Prav tako so pri ER+ raku dojk pogoste aktivacijske mutacije v genu *PIK3CA*, ki se pojavljajo pri skoraj 40 % tumorjev. Bolniki z aktivacijskimi mutacijami v genu *PIK3CA* bodo predvidoma dobro odgovorili na zdravljenje z zaviralci PI3 kinaz. Sicer naj bi bile mutacije v genu *PIK3CA* večinoma prisotne že v primarnih tumorjih, kar pomeni, da zadostuje testiranje arhivske primarne biopsije, če ni možno pridobiti biopsije ob ponovitvi ali napredovanju bolezni. Poleg mutacij v genu *ESR1* so po izsledkih novejših študij na novo pridobljene mutacije v genu *PIK3CA* lahko vzrok za neodzivnost na hormonsko zdravljenje.

Zarodne mutacije v genih *BRCA1/2* so prisotne pri približno 5 % bolnikov z rakom dojk. Pričakovati je, da bi večino teh zarodnih mutacij odkrili tudi pri genotipizaciji tumorjev, hkrati s temi pa še nekaj dodatnih somatskih mutacij. Kljub temu se je treba zavedati, da genotipizacija vzorcev tumorjev, vklopljenih v parafin ni enakovredna genotipizaciji normalnega (netumorskega) tkiva, ko je govora o natančni opredelitvi zarodnih mutacij. Lahko se namreč zgodi, da z genotipizacijo vzorcev tumorjev, vklopljenih v parafin, spregledamo določene mutacije tipa velikih strukturnih sprememb (velike delecije in insercije). Poleg tega so v tem trenutku za zdravljenje z zaviralci PARP pomembne izključno zarodne mutacije. Pričakovati pa je, da bodo kmalu na voljo dokazi o enakovrednem vplivu somatskih mutacij v tumorjih raka dojk pri odločitvi o zdravljenju, kot je to primer pri raku jajčnikov. Nenazadnje ne smemo pozabiti tudi na sicer redke, a pomembne aktivacijske mutacije v genu *ERBB2 (HER2)*, ki sprožijo prekomerno aktivacijo brez pomnožitve gena. Tudi te mutacije lahko odkrijemo pri genotipizaciji tumorjev.

Poleg odkrivanja klinično pomembnih mutacij v zgoraj navedenih genih nam genotipizacija tumorjev omogoča opredelitev mutacijskega bremena v tumorju (TMB) in določanje določenih mutacijskih vzorcev v tumorju, kot je npr. okvara homologne rekombinacije ali okvara genov, ki so odgovorni za popravljanje neujemanj pri podvojevanju DNA (MMR geni).

Tekočinske biopsije

Obetaven način odvzema vzorcev za molekularno diagnostiko predstavljajo tekočinske biopsije. Pri tem odvzamemo kri in iz plazme izoliramo DNA. Gre za odvzem, ki je bistveno manj agresiven, kot so odvzemi (punkcije) iz tumorjev ali kostnega mozga. Takšen pristop temelji na predpostavki, da tumorji ob razpadu celic izločajo v kri DNA, ki jo lahko uporabimo za genotipizacijo. Pomanjkljivosti tega pristopa sta predvsem majhna količina DNA, ki jo izloča tumor, v primerjavi z DNA iz zdravih celic, ter premalo občutljive metode za zaznavanje genetskih sprememb. Kljub temu je ta pristop lahko uporaben, kadar nimamo na voljo tumorskega tkiva in kadar želimo pri napredovalem raku določiti spremembe, ki so nastale med zdravljenjem in ponovnim progresom tumorja. Velikokrat se omenja možnost uporabe tekočinskih biopsij za dokazovanje mutacij v genu *ESR1* po zdravljenju z zaviralci aromataz. Sicer pa je v letošnjem letu (2022) ESMO izdal smernice za uporabo krožeče tumorske DNA (ctDNA) za genotipizacijo pri bolnikih z različnimi raki, vključno z rakom dojk. V smernicah posebej navajajo možnost uporabe tekočinskih biopsij in ctDNA za dokazovanje mutacij v genu *ESR1*. Posebej pa opozarjajo na tehnične možnosti in pomanjkljivosti metode in pazljivo interpretacijo rezultatov. Mnogi tumorji dojk sprostijo v kri zelo majhno količino ctDNA in so zato lahko rezultati pri nekaterih bolnikih lažno negativni. Negativne rezultate ctDNA analize bi bilo nujno preveriti (potrditi) z genotipizacijo tumorskega tkiva, pridobljenega z biopsijo. Tekočinske biopsije lahko uporabimo tudi za kvantitativno spremljanje ctDNA. Ta pristop se glede na trenutne pomanjkljivosti metod za genotipizacijo ctDNA kaže kot obetaven pristop za spremljanje dinamike rakave bolezni.

Zaključek

Molekularna diagnostika raka dojk, ki jo izvajamo na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana, temelji na mednarodnih smernicah za genotipizacijo zarodnih in somatskih mutacij. Pri tem uporabljamo najsodobnejše in preverjene metode testiranja kot so verižna reakcija s polimerazo (PCR), kvantitativni PCR v realnem času (Q-PCR), neposredno sekvenciranje po Sangerju in sekvenciranje druge (naslednje) generacije (NGS). Za dedne in sporadične oblike raka pripravljamo strukturirane izvide, ki vključujejo vse potrebne informacije za klinične genetike, patologe in lečeče onkologe.

Viri in literatura

1. Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Breast Cancer Version 4.2022 (https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf).
2. Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic Version 1.2023 (https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf).
3. Gennari A, André F, Barrios C.H., et al. on behalf of the ESMO Guidelines Committee. Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2021; 32:1475-95.
4. Novaković S. Molekularnobiološke značilnosti ginekoloških rakov in raka dojk. V: Takač I (ur.), Arko D. Ginekološka onkologija. 1. izd. Maribor: Univerzitetna založba Univerze, 2020. Str. 49-56.
5. Pascual J, Attard G, Bidard F.-C. et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol* 2022; 33:750-68.