

MOLEKULARNA DIAGNOSTIKA: OD OBLJUB DO RUTINSKE KLINIČNE PRAKSE – IN NAPREJ

Doc. dr. Vida Stegel, univ. dipl. biol., spec. lab. med. gen.

Oddelek za molekularno diagnostiko, Onkološki inštitut Ljubljana

Povzetek

Pred desetimi leti je molekularno-genetska diagnostika na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana zajemala predvsem genotipizacijo posameznih pogostih mutacij pri gastrointestinalnih tumorjih, raku debelega črevesa in danke ter melanomu, določanje klonalnosti in translokacij pri limfomih ter genotipizacijo zarodnih sprememb pri dednih rakih. Od takrat se je povečal nabor tako testiranih mutacij kot tudi tarčnih genov. Hkrati se je povečalo tudi število različnih vrst solidnih tumorjev, kjer je molekularna diagnostika postala nujna za določanje prediktivnih, diagnostičnih in prognostičnih molekularno-genetskih bioloških označevalcev. Nova tehnologija sekvenciranja druge generacije je omogočila hkratno zaznavanje večjega števila sprememb in s tem omogočila razmah molekularno-genetske diagnostike. Poleg točkovnih mutacij in fuzij med biološke označevalce uvrščamo tudi tiste, ki združujejo več sprememb, kot so razlike v izražanju več genov, mikrosatelitska nestabilnost, mutacijsko breme tumorja in določanje okvare homologne rekombinacije. V prihodnosti pričakujemo dodatno povečanje indikacij za testiranje in nove biološke označevalce, osnovane na spremembi izražanja genov, metilacije ali genomskih sprememb. V molekularni diagnostiki dednih rakov pričakujemo boljše zaznavanje večjih genomskih preureditev z metodami sekvenciranja daljših odčitkov.

Uvod

Molekularna diagnostika je v zadnjih letih postala nepogrešljiv del onkologije. V zadnjem desetletju se je njena uporaba močno razširila – od odkrivanja zarodnih genetskih sprememb, povezanih z večjim tveganjem za razvoj raka, do opredelitve genetskih sprememb, pomembnih za postavitev diagnoze, izbor zdravljenja ali za prognozo.

Pred desetimi leti smo pričakovali, da se bo z leti povečalo število genetskih bioloških označevalcev, ki bodo pomembni za diagnozo, zdravljenje ali prognozo bolnika z rakom. Prav tako smo pričakovali povečano število različnih vrst tumorjev, kjer bo

testiranje genetskih bioloških označevalcev pomembno. Oboje se je uresničilo tudi na Onkološkem inštitutu Ljubljana. Število testiranj se je povečalo predvsem na račun bolniku prilagojene medicine, kjer pomembno vlogo igrajo tarčna zdravila in z njimi povezani prediktivni biološki označevalci.

Večanje števila posameznih bioloških označevalcev in genotipizacija novih vrst tumorjev

Leta 2016 in 2017 je večino genotipizacij predstavljala genotipizacija tumorjev raka debelega črevesa in danke, melonoma, gastrointestinalnih stromalnih tumorjev (GIST) in limfomov. Pri genotipizaciji tumorjev raka debelega črevesa in danke in melanoma smo sprva uporabljali metodo alelna specifičnega pomnoževanja fragmentov s polimerazo v realnem času (RT-PCR), s katero smo določali najpogostejše mutacije v genih *KRAS*, *NRAS* in *BRAF* pri raku debelega črevesa in danke ter mutacije v genu *BRAF* pri melanomu za napoved odziva na zdravljenje z anti-EGFR protitelesi in zaviralci *BRAF*. Genotipizacijo tumorjev GIST smo izvajali s sekvenciranjem po Sangerju, usmerjenim v določene dele gena *KIT*.

Nabor prediktivnih bioloških označevalcev, zlasti najpogostejših, t. i. hot-spot mutacij, se je stalno povečeval. Določanju mutacij z RT-PCR smo pridružili določanje s pirosekvenciranjem.

Pri raku dojke se je kot pomemben biološki označevalec odziva na zdravljenje izkazala pomnožitev in povečano izražanja *HER2*, kar določajo že v okviru patohistološke preiskave tumorja. Leta 2018 smo pri raku HR+/HER2- raku dojke uvedli določanje mutacij v genu *PIK3CA*, ki predstavljajo biološki označevalec odziva na zdravljenje na zaviralci fosfatidilinozitol 3-kinaze.

Poleg povečevanja vrst različnih rakov, katerih tumorje genotipiziramo, se je povečalo tudi število bioloških označevalcev, ki so pri posamezni vrsti raka pomembni. Poleg bioloških označevalcev, specifičnih za posamezne tumorje, pri genotipizaciji tumorjev določamo tudi tumorske agnostične biološke označevalce, povezane z odzivom na zdravljenje pri več različnih solidnih tumorjih, ali celo pri vseh solidnih tumorjih. Taki biološki označevalci so npr. fuzije *NTRK1-3* in *RET* ter mutacije *BRAF V600E* in *KRAS G12C*.

Nabor bioloških označevalcev, povezanih z odzivom na zdravljenje pri posameznih vrstah raka, se je povečal. Pri melanomu poleg mutacij v genu *BRAF* pomembno vlogo igrajo tudi mutacije v genih *NRAS* in *KIT*, pri raku dojke pa dodatno še mutacije v genih *PTEN*, *AKT1* in *ESR1*. Poleg mutacije v onkogenih so klinično pomembni tudi biološki označevalci, povezani z mutacijami v tumor supresorskih genih. Tak primer so patogene različice/mutacije, ki povzročijo izgubo funkcije proteinov *BRCA1* in *BRCA2*,

in predstavljajo napovedne biološke označevalce za odziv na zdravljenje z zaviralci poli(ADP-riboza) polimeraze (PARP) pri raku jajčnikov, prostate in trebušne slinavke. Pri raku prostate se je nabor potencialno pomembnih tarčnih genov razširil na širši panel genov, povezanih s homologno rekombinacijo. Leta 2018 in 2019 smo na Oddelku za molekularno diagnostiko uvedli tudi testiranje raka jajčnikov in prostate, kasneje pa še pljučnega raka in trebušne slinavke.

Genetski biološki označevalci imajo lahko tudi diagnostični pomen. Najpogosteje jih določamo pri mezenhimskih tumorjih in limfomih. V teh primerih gre predvsem za specifične fuzijske transkripte, ki jih zaznamo z sekvenciranjem RNA prepisov, pri limfomih translokacije na nivoju DNA in klonalnost T- in B-celičnih receptorjev, pa tudi za točkovne mutacije, ki se značilno pojavljajo pri določenem podtipu tumorja.

Biološki označevalci, ki obsegajo skupek sprememb

Poleg obravnave in detekcije posameznih različic/mutacij v ospredje prihajajo tudi biološki označevalci, ki obravnavajo/obsegajo skupek sprememb, npr. specifičen vzorec izražanja genov, značilen odtis mutacij na genomu, značilen vzorec metilacije na genomu, ali število pridobljenih mutacij na megabazo (t. i. mutacijsko breme tumorja, angl. Tumor Mutational Burden, TMB).

Primer takih genetskih bioloških označevalcev sta tudi mikrosatelitska nestabilnost (angl. microsatellite instability, MSI) in določanje za okvaro homologne rekombinacije značilnih brazgotin/odtisovna genomu (HRD).

Mikrosatelitsko nestabilnost v tumorjih smo začeli testirati leta 2019 pri rakah debelega črevesa. Mikrosatelitska nestabilnost nastane zaradi okvare v genih MMR, t. j. genih za popravljanje (angl. mismatch repair), in sicer v enem od genov *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* in *MSH6*. Mikrosatelitska nestabilnost tumorjev je biološki označevalec, ki napove verjetni odziv na zdravljenje z zaviralcem imunskih nadzornih točk (pembrolizumabom). Zdravljenje s pembrolizumabom sta evropska in ameriška agencija za zdravila (EMA in FDA) odobrili pri vseh ne-resektabilnih in metastatskih solidnih mikrosatelitsko nestabilnih tumorjih. Podoben biološki označevalec je tudi mutacijsko breme tumorja, pri katerem je FDA leta 2020 prav tako odobrila zdravljenje vseh metastatskih solidnih tumorjev s TMB > 10 mutacij/megabazo spembrolizumabom (zaviralcem imunskih nadzornih točk). Tako MSI kot TMB sta torej tumorsko agnostična biološka označevalca.

Določanje okvare homologne rekombinacije je postalo pomembno predvsem pri epitelinih rakah jajčnikov. Prisotnost okvare homologne rekombinacije je biološki označevalec, ki napoveduje odziv na zdravljenje z zaviralci PARP.

Primer prognostično pomembnih bioloških označevalcev sta MammaPrint in Oncotype Dx, ki temeljita na razlikah v ekspresiji genov in omogočata razdelitev tumorjev dojk na prognostične skuine ter sta pomembna za odločitev o nadaljnem zdravljenju. Podobno so pri raku endometrija pomembni prognostični biološki označevalci tudi mutacije v genu *POLE*, *TP53* in izguba proteinov MMR. Določanje mutacij v genih *POLE* na Onkološkem inštitutu izvajamo od leta 2022.

Detekcija tumorske DNA v cirkulirajoči prostocelični DNA

Naslednje obetajoče področje molekularne diagnostike je detekcija tumorske DNA v cirkulirajoči prostocelični DNA (cfDNA). Genotipizacija cfDNA naj bi bila uporabna tako za zaznavanje znanih tumorskih sprememb z namenom spremljanja odziva na zdravljenje kot tudi za zaznavanje rezistentnih mutacij v cfDNA, ki so vzrok neodzivnosti na tarčna zdravila. Prva in druga uporaba genotipizacije cfDNA sta pri nekaterih tipih traka že klinično uveljavljeni in opisani tudi v smernicah; tak primer sta nedrobnocelični rak pljuč in rak dojk.

Ena od možnih uporab genotipizacije cfDNA bi lahko bila tudi zgodnja detekcija tumorske DNA pri asimptomatskih bolnikih. Ta pristop sicer zahteva visoko občutljivost metode ter visoko natančnost sekvenciranja, Proizvajalci sekvenatorjev v kratkem obljublajo doseganje kakovosti Q40-Q50, kar pomeni približno 1 napačno določeno baza na 10^4 oz. 10^5 določenih baz. Trenutna natančnost sekvenatorjev druge generacije je približno Q30, kar pomeni 10- do 100-krat večjo stopnjo napak.

Četrta možna uporaba genotipizacije cfDNA je spremljanje ostanka preostale bolezni po operaciji, kot prognostični dejavnik. Prisotnost tumorske DNA v cfDNA bi lahko v teh primerih usmerila odločitev o dodatnem zdravljenju, npr. s kemoterapijo.

Farmakogenetika – določanje sprememb, ki vplivajo na presnovo zdravil

Preiskave farmakogenetike, ki ugotavljajo prisotnost specifičnih polimorfizmov v genih *DPYD* in *UGT1A1*, ki vplivajo na presnovo kemoterapevtikov, lahko usmerjajo zdravnika v prilagajanje doze zdravila in na ta način zmanjševanje neželenih učinkov.

Določanje metilacije specifičnih genov

Določanje metilacije kot biološkega označevalca se lahko uporablja tako v diagnostične kot teranostične namene. Npr. metilacija promotorja gena *MLH1*, ki jo na OIL-MD izvajamo od 2019, je biološki označevalec za izključevanje sindroma Lynch. Metilacija promotorja gena *BRCA1* je običajno vzrok za okvaro homologne rekombinacije, ki je biološki označevalec za odziv na zdravljenje z zaviralci PARP.

Biološki označevalci pri dednih rakih

Pri dednih rakih z analizo genov, povezanih z različnimi vrstami dednih rakov, določamo diagnostično pomembne biološke označevalce, ki hkrati napovedujejo ogroženost za razvoj raka pri nosilcih mutacij. V določenih primerih, npr. pri patogenih različicah v genih *BRCA1/2*, imajo ti označevalci tudi napovedni pomen za odziv na zdravljenje z zaviralci PARP.

Pri dednih rakih se lahko kot napovedni dejavnik ogroženosti uporablja tudi poligeni indeks ogroženosti (angl. polygenic risk score – PRS), ki se npr. pri raku dojke in jajčnikov izračuna na podlagi več kot 300 polimorfni mest, povezanih z ogroženostjo za nastanek raka. V prihodnosti je uvedba PRS eden izmed ciljev na molekularne diagnostike dednih rakov na Onkološkem inštitutu Ljubljana.

K razjasnitvi različic nejasnega kliničnega pomena lahko pomembno prispeva tudi analiza sprememb na ravni RNA.

Zaključek

V prihodnosti pričakujemo, da bodo molekularno-genetske preiskave, ki kombinirajo zaznavanje patogenih različic, sekvenciranje genoma in zaznavanje razlik v izražanju genov, v diagnostiki tumorjev verjetno vse pomembnejše pri molekularni stratifikaciji tumorjev glede na prognozo. Poleg tega bodo v kombinaciji z drugimi diagnostičnimi metodami v pomoč pri opredelitvi sumljivih sprememb z neznanim malignim potencialom, npr. opredelitvi ščitničnih nodusov in podobno. Prav tako so molekularno-genetske preiskave pomembne za prognostično stratifikacijo nekaterih limfomov.

Pri uporabi molekularne diagnostike dednih rakov pričakujemo razvoj novih testov določanja PRS pri različnih rakih in izboljšano zaznavanje patogenih različic s sekvenciranjem dolgih fragmentov, ki omogoča zaznavanje večjih genomskih preureditev.

Viri in literatura

1. Cremolini C, Chalabi M, Elez E, Fassan M, Gelli M, Goéré D, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2026 Apr. doi:10.1016/j.annonc.2026.03.005
2. Cervantes A, Adam R, Roselló S, Arnold D, Normanno N, Taïeb J, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2023 Jan;34(1):10–32. doi:10.1016/j.annonc.2022.10.003 PubMed PMID: 36307056.

3. Amaral T, Ottaviano M, Arance A, Blank C, Chiarion-Sileni V, Donia M, et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2025 Jan;36(1):10–30. doi:10.1016/j.annonc.2024.11.006
4. González-Martín A, Harter P, Leary A, Lorusso D, Miller RE, Pothuri B, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2023 Oct;34(10):833–48. doi:10.1016/j.annonc.2023.07.011
5. Miller RE, Leary A, Scott CL, Serra V, Lord CJ, Bowtell D, et al. ESMO recommendations on predictive biomarker testing for homologous recombination deficiency and PARP inhibitor benefit in ovarian cancer. *Ann Oncol*. 2020 Dec;31(12):1606–22. doi:10.1016/j.annonc.2020.08.2102 PubMed PMID: 33004253.
6. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2020 Nov;31(11):1491–505. doi:10.1016/j.annonc.2020.07.014 PubMed PMID: 32853681.
7. Mosele MF, Westphalen CB, Stenzinger A, Barlesi F, Bayle A, Bièche I, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with advanced cancer in 2024: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Annals of Oncology*. 2024 Jul;35(7):588–606. doi:10.1016/j.annonc.2024.04.005
8. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020 May 28;382(22):2091–102. doi:10.1056/NEJMoa1911440
9. Parker C, Castro E, Fizazi K, Heidenreich A, Ost P, Procopio G, et al. Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2020 Sep;31(9):1119–34. doi:10.1016/j.annonc.2020.06.011
10. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, Bosse T, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Annals of Oncology*. 2019 Aug;30(8):1232–43. doi:10.1093/annonc/mdz116
11. Škerl P, Vogrič V, Stegel V, Šetrajčič Dragoš V, Blatnik O, Klančar G, et al. Real-World Evaluation of Microsatellite Instability Detection via Targeted NGS Panels in Routine Molecular Diagnostics. *Int J Mol Sci*. 2025 Jul 24;26(15):7138. doi:10.3390/ijms26157138