



Universiteit
Leiden
The Netherlands

RAD51 as biomarker for the identification of homologous recombination deficient gynaecological carcinomas

Wijk, L.M. van

Citation

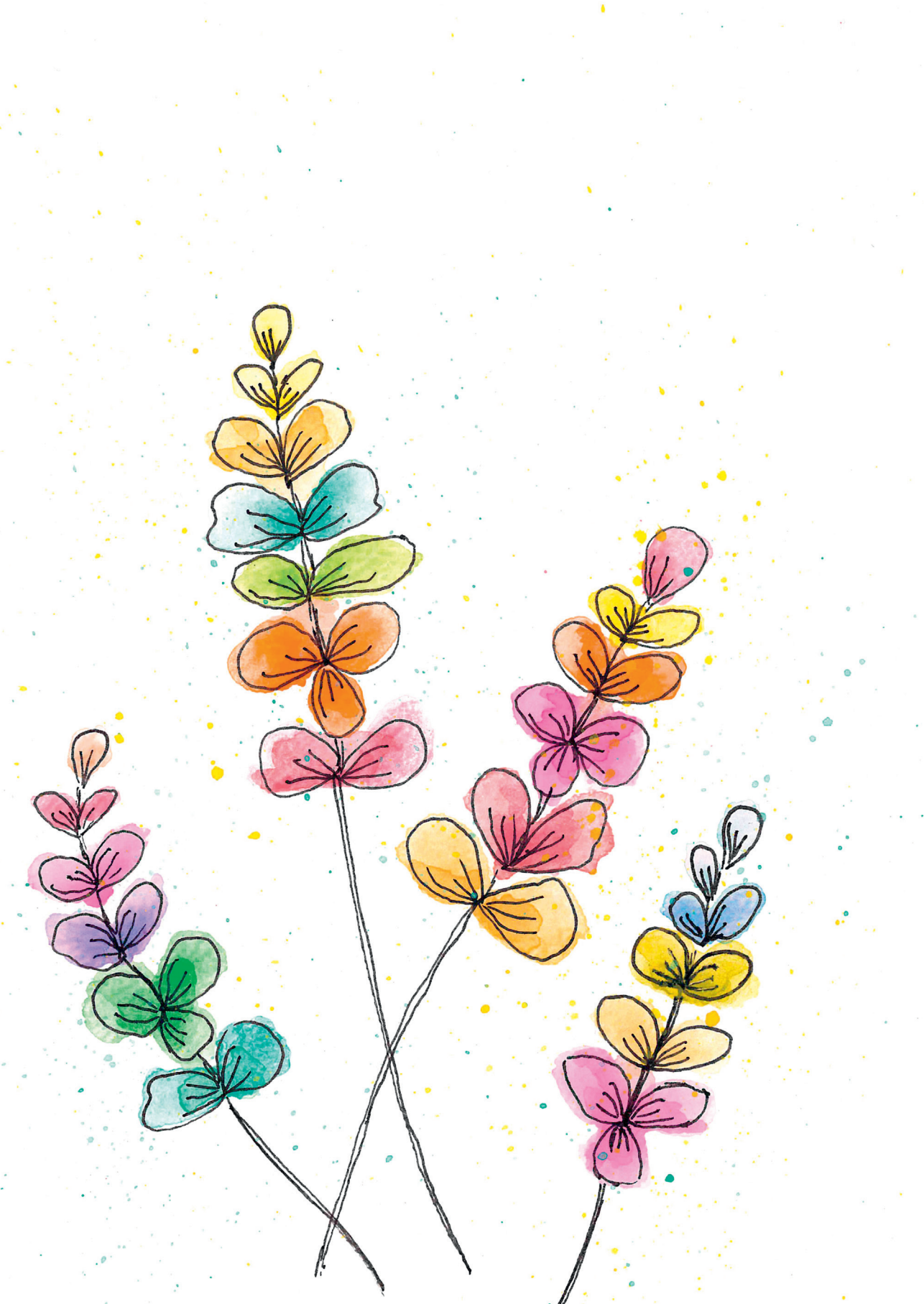
Wijk, L. M. van. (2024, June 12). *RAD51 as biomarker for the identification of homologous recombination deficient gynaecological carcinomas*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3762708>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3762708>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Appendices

Nederlandse samenvatting

List of publications

Curriculum Vitae

Acknowledgements

Nederlandse samenvatting

Introductie

Dit proefschrift beschrijft het proces van het vertalen van een fundamenteel inzicht naar de ontwikkeling van een (pre-)klinisch toepasbare test. De ontwikkeling van een nieuwe klinische test of nieuw geneesmiddel is een grote uitdaging die geduld, creativiteit, investeringen en bovenal samenwerking vereist.

De patiënt speelt een centrale rol in de geneeskunde en biomedische wetenschappen, waar we voortdurend op zoek zijn naar manieren om behandelingsprocedures te optimaliseren. Het is echter pas sinds kort dat we voor veel ziekten zijn overgestapt van het 'one-size-fits-all' principe waarbij een behandeling voor een hele patiëntengroep wordt ingezet naar een meer gepersonaliseerde therapie (personalised medicine). Deze verandering is duidelijk zichtbaar in de oncologie; met de komst van nieuwe doelgerichte therapieën zoals poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) remmers en immuun checkpoint remmers, wordt de vraag 'wie moet waarmee behandeld worden' complexer. Daarnaast moeten zorgverleners beslissen wanneer en hoe lang deze doelgerichte therapieën gegeven moeten worden, en of dit naast of in plaats van conventionele therapieën (bijv. chirurgie, chemotherapie en bestraling) gedaan moet worden. Biomarkers spelen een cruciale rol in deze besluitvorming, met name bij gepersonaliseerde therapie. Ze kunnen worden gebruikt om de tumor te karakteriseren, moleculaire aangrijpingspunten voor doelgerichte therapie te identificeren, potentiële resistentiemechanismen aan het licht te brengen en om te voorspellen of een patiënt baat heeft bij een bepaalde therapie. Vanwege hun belangrijke rol in de kliniek kan de validatie van een nieuwe biomarker in het gunstigste geval meerdere jaren in beslag nemen, waarbij de typische fasen van ontdekking en vroege validatie, retrospectieve validatie, prospectieve validatie, wettelijke goedkeuring en uiteindelijk klinische implementatie worden doorlopen.

Eén van de biomarkers die momenteel in de validatie fase zit (zowel retrospectief als prospectief) is homologe recombinatie deficiëntie (HRD), welke wordt geëvalueerd als voorspellende biomarker voor PARP remmer /platinum-gevoeligheid bij patiënten met kanker. Homologe recombinatie (HR) is het proces waarbij dubbelstrengsbreuken in het DNA foutloos gerepareerd worden. Het herstel van deze vorm van DNA schade is noodzakelijk voor het behoud van genomische stabiliteit. Niet gerepareerde DNA schade kan leiden tot celdood of permanente veranderingen in het DNA. HR vindt plaats in cellen die zich delen, waarbij de homologe DNA streng dient als template voor de reparatie van de andere DNA streng. De eiwitten BRCA1, BRCA2 en RAD51 spelen een cruciale rol in HR. Wanneer een cel niet in staat is HR uit te voeren (HR-Deficiënt of HRD) is hij afhankelijk

van andere DNA-reparatie mechanismen die het DNA vaak niet foutloos kunnen repareren. Hierdoor ontstaan er afwijkingen in het DNA die tot kanker kunnen leiden. Eén van de best omschreven oorzaken van HRD is de aanwezigheid van een pathogene variant (PV) in de *BRCA1* of *BRCA2* genen. In 2005 werd voor het eerst omschreven dat cellen met een volledig geïnactiveerd *BRCA1* of *BRCA2* gen gevoelig waren voor behandeling met PARP remmers via het “synthetische letaliteit” principe, waarbij door remming van het PARP1 eiwit ook enkelstrengs DNA breuken niet meer gerepareerd kunnen worden. Tijdens de celdeling worden de enkelstrengsbreuken omgezet in dubbelstrengsbreuken en in de afwezigheid van HR leidt dit uiteindelijk tot een accumulatie van DNA schade met celdood als gevolg. De klinische studies die hierop volgden lieten zien dat patiënten met *BRCA1/2* deficiënte en/of HRD tumoren baat hadden bij behandeling met PARP remmers, wat leidde tot de EMA (European Medicines Agency) en FDA (U.S. Food & Drug Administration) goedkeuring van PARP remmers bij behandeling van diverse kankersoorten waarbij er sprake is van *BRCA1/2* deficiëntie en/of HRD. Zowel de EMA als de FDA hebben PARP remmers goedgekeurd voor de behandeling van platinum-gevoelige ovariumkanker (bij terugkerende ziekte), HER2-negatieve *BRCA1/2* deficiënte borstkanker, platinum-gevoelige *BRCA1/2* deficiënte alvleesklierkanker en *BRCA1/2* deficiënte prostaatkanker. Daarnaast heeft de FDA de PARP remmer olaparib goedgekeurd als onderhoudsbehandeling voor platinum-gevoelige, *BRCA1/2* deficiënte of uitgezaaide, HRD ovariumkanker. De EMA heeft het gebruik van olaparib ook goedgekeurd bij platinum-gevoelige nieuw-gediagnosticeerde patiënten met *BRCA1/2* deficiënte gevorderde ovariumkanker en bij platinum-gevoelige gevorderde ovariumkanker waarbij er sprake is van HRD. Ondanks dat de PARP remmers rucaparib en niraparib door de EMA zijn goedgekeurd als onderhoudsbehandeling van platinum-gevoelige terugkerende ovariumkanker onafhankelijk van de *BRCA*/HR-status, heeft de NVMO-commissie BOM in Nederland onlangs aanbevolen dat niraparib alleen ingezet zou moeten worden als er ook is aangetoond dat de tumor *BRCA1/2*-deficiënt of HRD is. Het debat over de criteria waaraan de tumor van de patiënt moet voldoen voor behandeling met PARP remmers is nog steeds gaande. Ook kan de manier waarop de HR status is bepaald invloed hebben op de mogelijkheid van een patiënt tot het krijgen van PARP remmers.

Historisch gezien heeft de genetische *BRCA*-status gediend als een belangrijke standaard voor de ontwikkeling van zowel DNA-gebaseerde als functionele HRD testen. Tumoren met een *BRCA1* of *BRCA2* PV verliezen namelijk vrijwel altijd het wildtype allel via “loss of heterozygosity” waardoor ze dus HRD zijn. De HRD test zou dus op zijn minst de samples met *BRCA1/2*-deficiëntie als HRD moeten identificeren. We weten nu echter dat ook PV's in andere HR-gerelateerde genen kunnen leiden tot HRD. Bij ovariumcarcinomen gaat het vooral om inactiverende mutaties in de genen *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *NBS1*, *BRIP1* en *PALB2*, en amplificatie van *EMSY* die kunnen leiden tot HRD. Ook promoter

hypermethylering van *BRCA1*, *RAD51C* en *PALB2* is beschreven als mogelijke oorzaak van HRD in ovariumcarcinomen. In borstcarcinomen worden naast PV's in *BRCA1/2* ook PV's in *PTEN*, *PALB2*, *CHEK2*, *ATM* en *RAD51C* beschreven in de context van HRD. Voor prostaatcarcinomen worden PV's in *ATM* en *CHEK2* gecorreleerd aan HRD en veranderingen in de *ATM*, *PALB2*, *CHEK1*, *RAD50*, *BARD1*, *FANCA* en *ARID1A* genen zijn sterk geassocieerd met alvleeskliercarcinomen. Er is nog weinig bekend over het effect van PV's in andere HR-gerelateerde genen op PARP remmer gevoeligheid.

Studies die andere onderliggende oorzaken van HRD onderzoeken zijn nog gaande en beschrijven ook andere mechanismen dan (epi)genetische defecten in HR-gerelateerde genen die HRD kunnen veroorzaken, zoals veranderingen in RNA-bindende eiwit coderende genen. We zien waarschijnlijk alleen het topje van de ijsberg als we tumoren sequencen om PV's in HR-gerelateerde genen te identificeren. Aanvullende of andere testen zijn nodig om ook de HRD tumoren in beeld te krijgen die geen HR-gerelateerde PV's hebben. Twee door de FDA goedgekeurde diagnostische HRD testen, de Myriad MyChoice® CDx en FoundationOne® CDx, meten zowel genetische als genomische veranderingen, met de gedachte dat HRD leidt tot het preferentieel voorkomen van bepaalde type DNA veranderingen, ook wel “genomic scars” of “mutational signatures” genoemd. Van deze twee is de Myriad MyChoice® CDx de meest gebruikte HRD test om patiënten met HRD ovariumcarcinoom te identificeren die in aanmerking komen voor behandeling met PARP remmers. De test berekent een genomische score die bestaat uit de som van LOH (loss of heterozygosity), TAI (telomeric allelic imbalances) en LST (large-scale transitions). Verschillende klinische onderzoeken waarin de Myriad MyChoice® CDx-test werd gebruikt om tumoren als HRD te classificeren, meldden echter dat ook patiënten met een tumor die als HR-Proficiënt (HRP) was geclassificeerd, gevoelig waren voor behandeling met PARP remmers. Dit benadrukt dat de specificiteit van de Myriad MyChoice® CDx-test nog suboptimaal is. Mede hierom wordt er nog steeds vanuit zowel de academie als bedrijven geïnvesteerd in de ontwikkeling van alternatieve HRD testen. Nieuwe en verbeterde HRD-testen bieden de mogelijkheid om beter te bepalen welke patiënten het meeste baat zullen hebben bij een behandeling met PARP remmers en/of platinum-bevattende chemotherapie. Naast de de Myriad MyChoice® CDx-test en de FoundationOne® CDx test zijn er nog andere zogenaamde DNA-gebaseerde HRD testen ontwikkeld, waarbij DNA gesequenced wordt en de aanwezigheid van HR-gerelateerde mutatie-profielen worden gemeten. Een geheel ander soort HRD test is een functionele HRD test, waarbij in een tumorcel aan de hand van eiwitexpressie wordt gemeten of deze daadwerkelijk op het moment van analyse in staat is HR uit te voeren. Hiervoor is geen sequencing van het DNA noodzakelijk. Dit type test staat centraal in dit proefschrift.

Inhoud van dit proefschrift

Hoofdstuk 2 vat de huidige ontwikkelingen van verschillende HRD testen, zowel DNA-gebaseerd als functioneel, samen. Elk van de beschreven HRD testen heeft potentie aangetoond als voorspellende biomarker voor PARP remmer/platinum-gevoeligheid, meestal binnen retrospectieve studies. De HRD testen verschillen echter onderling; iedere test heeft zijn eigen testparameters en HRD-thresholds en ze zijn vaak binnen één of enkele studies gevalideerd, waardoor het nog onduidelijk is hoe deze HRD testen presteren bij grote en diverse patiënten cohorten. Daarnaast is het ook belangrijk dat de betrouwbaarheid van deze HRD testen wordt gemeten in zowel de primaire als de recidiverende setting, aangezien tumoren in de loop van de tijd en onder druk van de behandeling evolueren, wat mogelijk kan resulteren in een PARP remmer/platinum-resistente tumor. Er zijn verschillende reversiemutaties in de *BRCA1*- en *BRCA2*-genen geïdentificeerd in *BRCA1/2*-deficiënte tumoren, die tot het (gedeeltelijke) herstel van de functie van het eiwit hebben geleid met resistentie tegen de behandeling als gevolg. Ons vermogen om dergelijke reversiemutaties te identificeren staat echter nog in de kinderschoenen, waardoor het nog steeds een uitdaging is om resistente tumoren op basis van een DNA-gebaseerde test op te sporen. De uitkomsten van DNA-gebaseerde HRD testen laten alle genomische en/of mutatie gebeurtenissen die hebben plaatsgevonden in de tumor zien, wat niet noodzakelijkerwijs de huidige HR-status van de tumor weerspiegelt. Daarnaast zijn veel DNA-gebaseerde HRD testen nog vrij complex en kan de analyse van de uitkomsten tijdrovend zijn. Om aan de behoefte van een real-time HRD test te voldoen, zijn er functionele HRD testen ontwikkeld die de actuele HR-status van een tumor kunnen meten. Deze testen meten of er accumulatie van het RAD51 eiwit op dubbelstrengsbreuken in het DNA plaatsvindt. Cellen die HR kunnen uitvoeren zullen opeenhoping van het RAD51 eiwit laten zien op plaatsen met een DNA beschadiging, de zogenaamde RAD51 foci. Deze foci kunnen worden aangetoond door hele dunne tumorplakjes te kleuren met fluorescerende antilichamen (co-IF). Onder de microscoop wordt dan bepaald in hoeveel tumorcellen RAD51 foci te zien zijn om aldus een maat te geven voor HR-capaciteit. Het percentage RAD51-positieve cellen over het totaal aantal delende tumorcellen wordt berekend en wanneer deze onder de zogenaamde HRD-threshold valt, is er sprake van HRD.

Hoofdstuk 3 beschrijft de validatie van de REcombinationCAPacity (RECAP) test, een functionele RAD51-gebaseerde HRD test waarbij een vers stukje tumor of biopt *ex vivo* wordt bestraald met röntgenstraling om DNA dubbelstrengsbreuken te introduceren en vervolgens gefixeerd en ingebed in paraffine voorafgaand aan een co-IF kleuring met DAPI, geminin (GMN; G2/S fase marker) en RAD51, in een cohort van 49 ovariumcarcinomen. De samples waren van verschillende histologische subtypen en van de 39 hooggradige

sereuze ovariumcarcinomen was 26% (10/39) geclassificeerd als HRD met de RECAP test; de tien ovarium tumor samples van een ander histologisch subtype waren allemaal geclassificeerd als HRP. De RECAP test bereikte een gevoeligheid van 100% voor de identificatie van *BRCA1/2* deficiënte tumoren. Daarnaast werd in een retrospectieve analyse een trend geobserveerd in een betere overleving van patiënten met hooggradig sereuze HRD ovariumcarcinomen in vergelijking met patiënten met hooggradig sereuze HRP ovariumcarcinomen na behandeling met platinum-bevattende chemotherapie.

Hoofdstuk 4 omschrijft de transitie van de RECAP test naar een nieuw ontwikkelde RAD51-gebaseerde HRD test, de 'RAD51-FFPE' test, waarbij gebruik wordt gemaakt van formaline-gefixeerd paraffine-ingebed (FFPE) diagnostisch tumor materiaal welke routinematig bij de afdeling pathologie worden gemaakt. Door gebruik te maken van dit materiaal werden belangrijke obstakels van de RECAP test, zoals de noodzaak van vers tumor materiaal en het gebruik van röntgenstraling, vermeden waardoor de test op termijn klinisch makkelijker te implementeren zou zijn. In totaal zijn 74 tumor samples (25 endometriumcarcinomen en 49 ovariumcarcinomen) geanalyseerd met zowel de RECAP als de RAD51-FFPE test en konden de optimale test parameters voor de RAD51-FFPE test waren bepaald. Een tumor is HR-Proficiënt indien meer dan 15% van de tumorcellen tenminste twee RAD51 foci per celkern heeft. Carcinomen waarvan 15% of minder van de tumorcellen RAD51 foci heeft zijn HRD. De RAD51-FFPE test bereikte een sensitiviteit van 90% voor de identificatie van *BRCA1/2* deficiënte carcinomen en een sensitiviteit van 87% voor de identificatie van RECAP-HRD carcinomen.

Hoofdstuk 5 bevat een evaluatie van de potentiële toepassing van de RAD51-FFPE test bij endometriumcarcinomen, omdat uit een eerder onderzoek met 25 endometriumcarcinomen was gebleken dat 24% van de samples als HRD werden geclassificeerd met de RECAP test. De observatie van HRD bij endometriumcarcinomen is pas recentelijk gemaakt en biedt nieuwe therapie mogelijkheden voor deze patiëntengroep. In dit hoofdstuk beschrijven we de functionele HR-status bepaling in een cohort van 94 endometriumcarcinomen, waaronder de 25 eerder geëvalueerde endometriumcarcinomen, met zowel de RAD51-FFPE als de RECAP test. Daarnaast is de HR-status geëvalueerd in relatie tot de Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) moleculaire subgroepen voor endometriumcarcinomen (*POLE* mutant, mismatch repair deficient (MMRd), no specific molecular subtype (NSMP) en p53 abnormal (p53abn)). Met de RAD51-FFPE test werd de helft van de endometriumcarcinomen geclassificeerd als HRD. Op basis van de RECAP status was 16% van de endometriumcarcinomen HRD. Alle RECAP-HRD samples waren geclassificeerd als RAD51-FFPE-HRD (100% sensitiviteit). RAD51-FFPE HRD endometriumcarcinomen waren vaker hooggradig en non-endometrioid. Daarnaast hadden patiënten met RAD51-FFPE-HRD tumoren vaker gevorderde ziekte.

HRD kwam voor in alle moleculaire subgroepen, maar werd het vaakst geobserveerd bij p53abn endometriumcarcinomen (83%). Gezien de hoge prevalentie van HRD bij endometriumcarcinomen is de RECAP test exploratief toegepast op een cohort van 28 cervixcarcinomen en 16 vulvacarcinomen. Dit onderzoek liet echter zien dat geen van de onderzochte cervix- en vulvacarcinomen geclassificeerd werden als RECAP-HRD.

Hoofdstuk 6 laat zien dat de RAD51-FFPE test met de eerder gevalideerde test parameters voor endometrium- en ovariumcarcinomen ook toegepast kan worden op borstcarcinomen. De RAD51-FFPE test en de RECAP test zijn beiden gebruikt op een cohort van 63 borstcarcinomen, waarbij 23 (37%) van de tumoren waren geclassificeerd als HRD met de RAD51-FFPE test. De RAD51-FFPE test bereikte een sensitiviteit van 88% voor de identificatie van RECAP-HRD met een specificiteit van 76% voor RECAP-HRP. De drie tumor samples waarin *BRCA1/2*-deficiëntie was aangetoond waren allemaal geclassificeerd als RAD51-FFPE-HRD (100% sensitiviteit).

Hoofdstuk 7 omvat het grootste validatiecohort van meer dan 200 triple-negatieve borstcarcinomen waarvoor gedetailleerde (epi)genetische gegevens van HR-gerelateerde genen en whole-genome sequencing (WGS)-gegevens beschikbaar waren, en waarop zowel HRDetect (een mutational signature score), een Genomic Scar test (som van LOH, TAI en LST) als de RAD51-FFPE-test waren uitgevoerd. Voor 249/265 (94%) tumor samples werd een RAD51-FFPE score berekend en daarmee werden 165/249 (66%) tumor samples geclassificeerd als HRD. Van de 204 samples waarvoor sequencing data beschikbaar was, hadden 38 (19%) samples een PV in *BRCA1*, *BRCA2* of *PALB2*. Tweeëndertig van de 38 (84%) tumor samples werden geclassificeerd als HRD door de RAD51-FFPE test. Daarnaast bleken 44/53 (83%) samples met *BRCA1* of *RAD51C* promotor hypermethylering geclassificeerd als RAD51-FFPE-HRD. Deze “benchmarking” analyse heeft aangetoond dat 54% van de samples geclassificeerd waren als HRD en 41% van de samples als HRP door alle drie HRD testen (HRDetect, Genomic Scar en RAD51-FFPE). De RAD51-FFPE test bereikte een sensitiviteit van meer dan 80% voor de identificatie van tumor samples die als HRD waren geïdentificeerd met een HRDetect of Genomic Scar test.

Conclusie

Dit proefschrift beschrijft de uitgebreide validatie en toepassing van twee RAD51-gebaseerde functionele HRD testen, waaronder de nieuw-ontwikkelde RAD51-FFPE test, op grote cohorten van gynaecologische carcinomen. De RAD51-FFPE test bereikte een hoge sensitiviteit voor de identificatie van ovarium-, endometrium en borstcarcinomen met *BRCA1/2* deficiëntie en/of RECAP-HRD scores. Daarnaast toonde de RAD51-FFPE test een hoge sensitiviteit voor de identificatie van triple-negatieve borstcarcinomen met een HRD score op basis van mutational signature en genomic scar analyses. De specificiteit

van de RAD51-FFPE test is echter nog suboptimaal, dus voor klinische toepassingen zou de test ingezet kunnen worden als pre-selectie test of kan complementatie van de test met een DNA-gebaseerde HRD test overwogen worden. Tot slot, door aan te tonen dat de RAD51-FFPE test succesvol kan worden toegepast op een breed scala aan tumor types, waarbij HRD met hoge sensitiviteit kan worden geïdentificeerd, hebben we de basis gelegd om functionele HRD te onderzoeken in relatie tot PARP remmer/platinum-gevoeligheid en de stap te zetten naar implementatie van de RAD51-FFPE test in de routinematige klinische praktijk.