

## Instabilita krátkych tandemových repetícií v onkológii: potenciál tekutej biopsie

Jakub Styk<sup>1,2,3</sup>, Matej Hrnčiar<sup>2</sup>, Ondrej Pös<sup>1,2</sup>, Silvia Bokorová<sup>1,2</sup>, Daniela Klimová<sup>3</sup>, Vanda Repiská<sup>3,4</sup>, Ján Radvánszky<sup>1,5</sup>, Tomáš Szemes<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

<sup>2</sup>Geneton, s.r.o., Bratislava

<sup>3</sup>Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

<sup>4</sup>MEDIREX GROUP ACADEMY n.o., Nitra

<sup>5</sup>Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Štúdie zamerané na inovácie diagnostických prístupov v oblasti personalizovaného manažmentu onkologických ochorení poukazujú na potrebu kontinuálneho progresu analýzy málo preštudovaných genomických variácií, akou je práve variabilita krátkych tandemových repetícií (STR)/mikrosatelitov, označovaná ako mikrosatelitová instabilita (MSI). Do popredia sa dostávajú alternatívne skriningové postupy využívajúce analýzu cirkulujúcich nukleových kyselín (cfDNA/ctDNA). Dôraz sa kladie na využitie potenciálu *high-throughput* technológií, akou je masívne paralelné sekvenovanie (MPS). Ukazuje sa, že komplexná genomická analýza mikrosatelitov môže zefektívniť proces stratifikácie pacientov s MSI asociovanými nádormi. V predkladanej práci diskutujeme o spôsoboch analýzy MSI pomocou inovatívnych a menej invazívnych metód založených na tekutej biopsii, ako aj o ich benefitoch a limitáciách. Poukazujeme na súčasný stav diagnostiky MSI v onkologickej praxi so zreteľom na presun zo sféry konvenčných stratégií k reaktívnym personalizovaným prístupom a cielenej prevencii.

**Kľúčové slová:** krátke tandemové repetície, mikrosatelitová instabilita, masívne paralelné sekvenovanie, tekutá biopsia, extracelulárna DNA

### Instability of short tandem repeats in oncology: the potential of liquid biopsy

Studies focused on innovations in diagnostic approaches in the personalized management of oncological diseases point to the need for continuous progress in the analysis of little-studied genomic variations, such as variability within short tandem repeats (STR)/microsatellites, referred to as microsatellite instability (MSI). Alternative screening procedures using the analysis of circulating nucleic acids (cfDNA/ctDNA) are coming to the fore. Emphasis is placed on utilizing the potential of high-throughput technologies such as massively parallel sequencing (MPS). It is shown that a comprehensive genomic analysis of microsatellites can streamline the process of stratification of patients with MSI-associated tumours. In the presented work, we discuss the methods of MSI analysis using innovative and less invasive methods based on liquid biopsy and their benefits and limitations. We point out the current status of MSI diagnostics in oncology practice regarding the shift from the sphere of conventional strategies to reactive personalized approaches and targeted prevention.

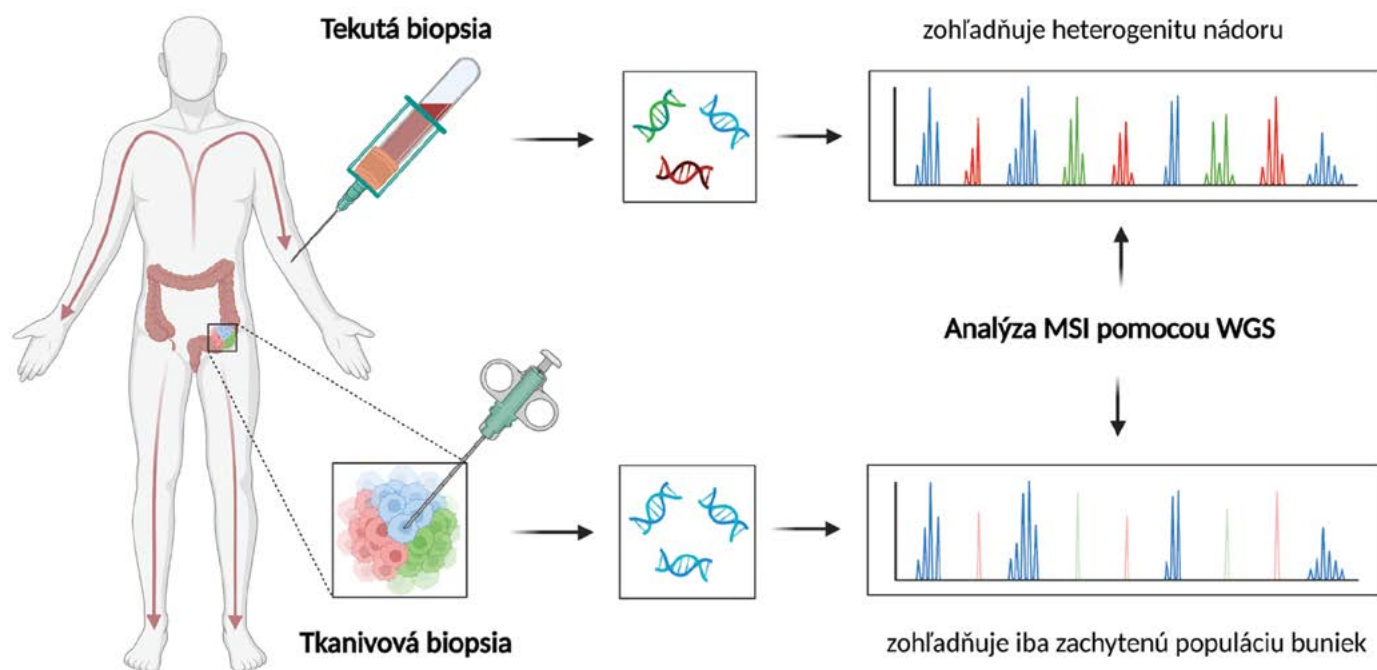
**Keywords:** short tandem repeats, microsatellite instability, massively parallel sequencing, liquid biopsy, extracellular DNA

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 83 – 86

### Úvod

Krátke tandemové repetície (STR – z angl. *short tandem repeats*)/mikrosatelity patria medzi najrýchlejšie mutujúce oblasti v ľudskom genóme a sú zdrojom genetickej variability, ktorá bola historicky dlhodobo podceňovaná. Dnes je už všeobecne známe, že sa spájajú s množstvom dobre opísaných fenotypov a patologických stavov<sup>(1,2)</sup>. Somatická STR variabilita nazývaná aj mikrosatelitová instabilita (MSI), je charakteristickým znakom niektorých onkologických ochorení. Je definovaná ako zmena v dĺžke STR motívov (typicky

tvorených 2 – 6 nukleotidovými opakovaniami zoradenými niekoľkokrát za sebou)<sup>(3)</sup>. STR lokusy zvyknú akumulovať indely (inzercie a delécie nukleotidov v menšom rozsahu) viacerých básových párov v dôsledku zlyhania opravného mismatch repair (MMR) mechanizmu<sup>(4)</sup>. MSI sa vyskytuje zhruba v 10 – 15 % kolorektálnych, gastrických a endometriálnych karcinómov a menej často v iných solídnych nádoroch. Tento fenotyp replikačnej chyby je považovaný za poznávacie znamenie dedičného predispozičného nádorového ochorenia, Lynchovho syndrómu (LS)<sup>(5)</sup>. Nádory sú klasifikované na



**Obrázok 1.** Tkanivová biopsia analyzuje diskretnú časť nádoru a nemusí zachytiť komplexnú mieru intratumorovej heterogenity (iba modré bunky). Je známe, že DNA z celého nádoru je konštantne uvoľňovaná do krvného obehu. Tekutá biopsia tak dokáže zachytiť ctDNA z celej populácie nádorových buniek (červené, modré a zelené bunky). S využitím prístupov na platforme MPS v kombinácii s tekutou biopsiou je tak možné v jednom skriningovom teste analyzovať instabilitu v širšom spektre STR lokusov (v desiatkach až tisícach STR motívov naprieč genómom). Takéto diagnostické stratégie poskytujú najreprezentatívnejšiu metódu pre personalizovaný, prediktívny a cieľový skrining MSI, ktorý môže predstavovať ľahko implementovateľný doplnok iných diagnostických testov vychádzajúcich z podstaty analýzy ctDNA/cfDNA a celogenómového MPS (vytvorené pomocou BioRender.com).

základe proporcie nestabilných STR motívov do troch tried: MSI-H tumory a MSI-L tumory (podľa podielu instabilných motívov) a mikrosatelitovo stabilné tumory (MSS) bez detegovateľnej instability v analyzovaných STR motívoch. V súčasnosti sa objavuje konsenzus postačujúcej binárnej klasifikácie: MSI a MSS<sup>(6)</sup>, vzhľadom na podobnosť klinických aspektov medzi MSI-L a MSS malignitami<sup>(7)</sup>. Pacienti s nádormi s preukázanou MSI majú v porovnaní s MSS lepšiu prognózu v skorých štádiách ochorenia a znížený benefit z adjuvantnej chemoterapie na báze 5-fluorouracilu v II. a III. štádiu<sup>(8)</sup>. Naopak, MSI predstavuje jeden z hlavných prediktorov odpovede pacienta na inovatívne protinádorové terapie prostredníctvom inhibície imunitných kontrolných bodov<sup>(9)</sup>.

## Metódy detekcie MSI na báze tekutej biopsie

Konvenčné metódy detekcie prítomnosti MSI ako imunohistochemia (IHC) a MSI-PCR sú stále najrozšírenejšími diagnostickými a skriningovými postupmi. Informačný potenciál reflektujúci variabilitu v STR motívoch je však v tomto prípade limitovaný dostupnosťou nádorového aj referenčného kontrolného tkaniva. Ich aplikácia je preto možná iba v prípade už diagnostikovaných a chirurgicky dostupných nádorov. Konvenčné a rutinne používané invazívne metódy sú tak čoraz častejšie suplované o menej invazívne techniky s možnosťou využitia vysoko citlivého sekvenovania fragmentov cell-free DNA/cirkulujúcej tumorovej DNA (cfDNA/ctDNA), extrahovaných z periférnej krvi. Ich benefit spočíva práve v detekcii MSI bez potreby predošlej znalosti o prítomnosti, lokalizácii a chirurgickej dostupnosti tumoru. Spoločným menovateľom štandardných diagnostických testov

vyšetrujúcich MSI v onkológii je invazívnosť, nemožnosť opakovaného monitorovania, nedostupnosť alebo obťažnosť bioptického vyšetrenia pri niektorých formách tumorov s neadekvátnym nádorovým tkanivom alebo ťažko dostupnou lokalizáciou<sup>(10,11)</sup> a v neposlednom rade neschopnosť reflektovania intratumorovej heterogenity (**obrázok 1**). Medzi technické obmedzenia môžeme zaradiť aj možnosť falošne pozitívnych, repsektíve falošne negatívnych výsledkov IHC analýz, ktoré vznikajú pri polymorfizmoch v STR lokusoch<sup>(12)</sup>.

Z uvedených dôvodov sa čoraz väčší počet laboratórií snaží zaradiť analýzu ctDNA do programov rutinného MSI skriningu<sup>(13,14)</sup>. ctDNA obsahuje genomické alterácie, ktoré umožňujú prekonanie intratumorovej heterogenity a zachytenie MSI statusu na úrovni celého nádoru<sup>(15,16)</sup>. Bolo pozorované, že disperzia počtu nestabilných STR lokusov nepriamo koreluje s hustotou mutácií nadmerne zastúpených v aktívne transkribovaných oblastiach. Relatívna deplécia MSI v stabilných polohách nukleozómov tiež hovorí, že konfigurácia chromatinu je hlavným determinantom jej distribúcie<sup>(17)</sup>. Vysoká koncentrácia variability STR lokusov bola pozorovaná aj v regulačných génových oblastiach, ako sú promótor a enhancer, v aktívne transkribovaných oblastiach (euchromatín) a v rámci intergénových, intronických a 3' neprekladaných oblastiach (3' UTR), na rozdiel od neaktívneho konštitutívneho heterochromatinu<sup>(18)</sup>. Komplexná analýza MSI na úrovni celého genómu má zároveň potenciál transformovať biomedicínsky dosah STR variability nad rámec bežných vyšetrení, s výraznou pridanou hodnotou pre onkologického pacienta. V prospech posunu diagnostiky MSI z oblasti reaktívnych prístupov k proaktívnemu skriningu na báze celoge-

nómového sekvenovania cirkulujúcich cfDNA/ctDNA hovoria štúdie preukazujúce vysokú mieru zhody v porovnaní s konvenčnou tkanivovou biopsiou<sup>(19,20)</sup>.

Potenciál využitia v manažmente pacientov<sup>(21,22)</sup>, ako aj testovanie MSI prostredníctvom ctDNA alebo cfDNA je stále v štádiu vývoja. Pred ich implementáciou je potrebné vyriešiť viaceré výzvy. Milníkom, ktorý stojí v aktívnejšom introdukovaní nových prístupov priamo k pacientovi je absencia štandardizovaných procedúr, protokolov a postupov ohľadom odberu, prípravy, spracovania, uskladnenia a validácie vzoriek v dostupných štúdiách. Tieto metodologické aspekty dokážu signifikantne ovplyvniť následné analýzy cfDNA/ctDNA a môžu viesť k biasom pri porovnávaní postupov naprieč štúdiami<sup>(23,24)</sup>. Napriek tomu, že tekutá biopsia môže byť diagnosticky spoľahlivou alternatívou s preukázateľne vysokou senzitivitou a špecificitou<sup>(19,20)</sup>, boli opísané aj niektoré jej limitácie<sup>(25)</sup>. Problémom sú najmä nádory s nízkou koncentráciou cirkulujúcich tumorových buniek a tiež tumory, ktoré uvoľňujú nízke koncentrácie fragmentov ctDNA do krvného obehu<sup>(26)</sup>.

Medzi dostupné testy využívajúce cfDNA patrí napríklad OncoLBx, vytvorený ako kombinácia jednomolekulového sekvenovania (SMSEQ) a panela, ktorý pozostáva zo 75 génov a 5 homopolymérnych markerov. Validáčny test preukázal, že OncoLBx dokáže detegovať variantné alely s frekvenciou  $\geq 0,1$  % pre SNV a indely,  $\geq 0,5$  % pre fúzie,  $\geq 4,5$  % pre CNV a  $\geq 2$  % pre MSI, pričom vykazuje špecifickosť  $\geq 99,99$  % pre všetky typy variantov<sup>(27)</sup>. Willis et al. demonštrovali robustnosť svojho prístupu pre detekciu MSI pomocou FDA schváleného testu Guardant360® CDx (Guardant Health, Redwood City, CA, USA). Preukázal vysokú citlivosť v porovnaní s metódami založenými na tkanivovej biopsii<sup>(19)</sup>. Sľubným sa zdá aj prístup pre paralelnú a neinvazívnu detekciu MSI a nádorovej mutačnej záťaže/nálože, ktorý je vysoko efektívny v predikcii protinádorovej odpovede na imunoterapiu. Vo validačných analýzach dosiahol 100 % senzitivitu a špecifickosť na párových vzorkách nádorového a zdravého tkaniva<sup>(28)</sup>. Rovnaké hodnoty zaznamenal aj FoundationOne® Liquid CDx (Foundation Medicine, Cambridge, MA, USA)<sup>(29)</sup>.

Vzhľadom na vysokú mieru fragmentácie a nízku frakciu ctDNA v krvi (0,01 % v skorých štádiách rakoviny) spolu s technickými artefaktmi generovanými počas laboratorného spracovania, sú potrebné robustné, validované a veľmi citlivé hodnotiace algoritmy a bioinformatické nástroje<sup>(26,29)</sup>. S využitím panela ColonCore a bioinformatického nástroja bMSISEA (blood MSI signature enrichment analysis) bola preukázaná testovacia senzitivita 94,1 % a špecifickosť 100 %

s minimálnou frakciou ctDNA 0,4 %. Daný algoritmus je schopný užívateľovi poskytnúť výstup v podobe binárnej klasifikácie vzoriek na MSI, respektíve MSS<sup>(30)</sup>. Nástroj MSIsensor-ct<sup>(31)</sup> vychádzajúci z MPS dát cfDNA dosiahol 100 % koreláciu s konvenčnými prístupmi, a to už pri minimálnej frakcii ctDNA nad 0,05 % a hĺbkou pokrytia viac ako 3 000x. Pri týchto špecifikáciách je hodnotiaci nástroj MSIsensor-ct schopný spoľahlivej detekcie MSI. Skoré a včasné zachytenie MSI pomocou analýzy tekutej biopsie má tak široké klinické využitie počas celoživotného sledovania nielen pacientov s kolo- rektálnym karcinómom. Môže umožniť: (i) efektívnejší manažment pacientov s LS a ich asymptomatických príbuzných, ktorí majú zvýšené celoživotné riziko vzniku asociovaných malignít; (ii) lepšiu prognózu z hľadiska indikácie liečby pre pacientov s vysokou mierou instabilných STR lokusov; (iii) vynechanie fluorouracilovej, karboplatinovej, a cisplatinovej adjuvantnej chemoterapie u pacientov s diagnostikovanou MSI, a to z dôvodu preukázateľne nízkej odpovede tumoru na dané formy terapie<sup>(8)</sup>; a (iv) predikciu účinnosti inovatívnych liečebných prístupov na báze imunoterapie, s cieľom identifikovať takých jedincov, pre ktorých môže byť takýto typ personalizovanej liečby prospešný<sup>(10)</sup>.

## Zhrnutie

Analýza MSI pomocou tekutej biopsie a stratégie vychádzajúcich z MPS predstavuje na základe dostupných štúdií sľubný prístup nielen v skorej detekcii, prediktívnej diagnostike a cielenej prevencii, ale taktiež v manažmente protinádorovej terapie a následného monitorovania odpovede. Takýto skrining ponúka možnosti pacientom so zvýšeným rizikom vzniku ochorenia súvisiaceho s MSI aj bez rodinnej anamnézy alebo pacientom, ktorých nádorové tkanivo je nedostupné, prípadne môže byť jeho získanie kontraindikované. Vďaka prekonávaniu rôznych technologických a bioinformatických limitácií vychádzajúcich z podstaty repetitívnych STR motívov a cfDNA/ctDNA sú prístupy detekcie MSI čoraz bližšie k ich plnohodnotnej implementácii do rutínnej klinickej diagnostiky.

## Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES - II. etapa, kód ITMS: 313011W428, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## LITERATÚRA

1. Buglío G, Styk J, Pös O, et al. Liquid Biopsy as a Source of Nucleic Acid Biomarkers in the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2022; 23. doi:10.3390/ijms23084284
2. Depienne C, Mandel J-L. 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? *Am J Hum Genet.* 2021; 108: 764-785.
3. Chambers GK, MacAvoy ES. Microsatellites: consensus and controversy. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2000; 126: 455-476.
4. Reyes GX, Schmidt TT, Kolodner RD, Hombauer H. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma.* 2015; 124: 443-462.

5. Buglío G, Styk J, Pös O, et al. Liquid Biopsy as a Source of Nucleic Acid Biomarkers in the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2022; 23. doi: 10.3390/ijms23084284
6. Redford L, Alhilal G, Needham S, et al. A novel panel of short mononucleotide repeats linked to informative polymorphisms enabling effective high volume low cost discrimination between mismatch repair deficient and proficient tumours. *PLoS One.* 2018; 13: e0203052.
7. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology.* 2015; 148: 77-87.e2.

8. Battaglin F, Naseem M, Lenz H-J, Salem ME. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018; 16: 735-745.
9. Rizzo A, Ricci AD, Gadaleta-Caldarola G. MSI-H/dMMR and cancer immunotherapy: current state and future implications. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*. 2021. pp. 345-347. doi: 10.1080/23808993.2021.1946391
10. Lenz H-J, Van Cutsem E, Luisa Limon M, et al. First-Line Nivolumab Plus Low-Dose Ipilimumab for Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: The Phase II CheckMate 142 Study. *J Clin Oncol*. 2022; 40: 161-170.
11. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019; 25: 3753-3758.
12. Cohen R, Hain E, Buhard O, et al. Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. *JAMA Oncol*. 2019; 5: 551-555.
13. Styk J, Buglyó G, Pös O, et al. Extracellular Nucleic Acids in the Diagnosis and Progression of Colorectal Cancer. *Cancers*. 2022; 14. doi: 10.3390/cancers14153712
14. Gahan PB. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum: Proceedings of the 6th international conference on circulating nucleic acids in plasma and serum held on 9-11 November 2009 in Hong Kong. Springer Science & Business Media; 2010.
15. Kasi PM. Mutational burden on circulating cell-free tumor-DNA testing as a surrogate marker of mismatch repair deficiency or microsatellite instability in patients with colorectal cancers. *J Gastrointest Oncol*. 2017; 8: 747-748.
16. Gargalionis AN, Papavassiliou AG. Liquid Biopsies in Colorectal Cancer: Monitoring Genetic Heterogeneity. *Trends Cancer Res*. 2017; 3: 166-168.
17. Kim T-M, Laird PW, Park PJ. The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell*. 2013; 155: 858-868.
18. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park W-Y, Kim T-M, Park PJ. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun*. 2017; 8: 15180.
19. Willis J, Lefterova MI, Artyomenko A, et al. Validation of Microsatellite Instability Detection Using a Comprehensive Plasma-Based Genotyping Panel. *Clin Cancer Res*. 2019; 25: 7035-7045.
20. Silveira AB, Bidard F-C, Kasperek A, Melaabi S, Tanguy M-L, Rodrigues M, et al. High-Accuracy Determination of Microsatellite Instability Compatible with Liquid Biopsies. *Clin Chem*. 2020; 66: 606-613.
21. Kubirytova Z, Radvanszky J, Gardlik R. Cell-Free Nucleic Acids and their Emerging Role in the Pathogenesis and Clinical Management of Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci*. 2019; 20. doi: 10.3390/ijms20153662
22. Szilágyi M, Pös O, Márton É, et al. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci*. 2020; 21. doi: 10.3390/ijms21186827
23. Pös Z, Pös O, Styk J, et al. Technical and Methodological Aspects of Cell-Free Nucleic Acids Analyzes. *Int J Mol Sci*. 2020; 21. doi:10.3390/ijms21228634
24. Neumann MHD, Bender S, Krahn T, Schlange T. ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy - Current Status and Where We Need to Progress. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018; 16: 190-195.
25. Ding Y, Li W, Wang K, Xu C, Hao M, Ding L. Perspectives of the Application of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer. *Biomed Res Int*. 2020; 2020: 6843180.
26. Wang L, Ajani JA. Ushering in Liquid Biopsy for the Microsatellite Status: Advantages and Caveats. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019. pp. 6887-6889.
27. Atkins A, Gupta P, Zhang BM, et al. Detection of Circulating Tumor DNA with a Single-Molecule Sequencing Analysis Validated for Targeted and Immunotherapy Selection. *Mol Diagn Ther*. 2019; 23: 521-535.
28. Georgiadis A, Durham JN, Keefer LA, et al. Noninvasive Detection of Microsatellite Instability and High Tumor Mutation Burden in Cancer Patients Treated with PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res*. 2019; 25: 7024-7034.
29. Woodhouse R, Li M, Hughes J, et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin. *PLoS One*. 2020; 15: e0237802.
30. Cai Z, Wang Z, Liu C, et al. Detection of Microsatellite Instability from Circulating Tumor DNA by Targeted Deep Sequencing. *J Mol Diagn*. 2020; 22: 860-870.
31. Han X, Zhang S, Zhou DC, et al. MSIsensor-ct: microsatellite instability detection using cfDNA sequencing data. *Brief Bioinform*. 2021; 22. doi: 10.1093/bib/bbaa402

**Mgr. Jakub Styk**

Vedecký park Univerzity Komenského  
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava  
e-mail: styk6@uniba.sk