

Masterarbeit

Implementierung des AmoyDx® HRD Focus Panels zur Testung der homologen Rekombinationsdefizienz bei Ovarialkarzinom

eingereicht von

Senka Rohregger

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (MSc)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt im Rahmen des

Universitätslehrgangs Master of Science in med. Genetik

am Institut für Pathologie des

Salzkammergut-Klinikums Vöcklabruck

unter der Anleitung von

Univ.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Dr.med. Cornelia Kronberger

Gmunden, 23.08.2023

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Gmunden, am 23.08.2023

Senka Rohregger eh.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	13
1.1..... Inzidenz, Prävalenz und Mortalität der Ovarialkarzinome	13
1.2. Subtypen des Ovarialkarzinoms	14
1.3. Homologe Rekombinations-Defizienz (HRD).....	18
1.4. Homologe Rekombinations-Defizienz als häufiges Merkmal der hochgradig serösen Ovarialkarzinome	20
1.5. Zielgerichtete Therapie mit Poly-ADP-Ribose- Polymerase-Inhibitoren.....	22
1.6. Homologe Rekombinationsdefizienz (HRD) Test	28
1.7. Qualitätssicherung	32
1.8. Ziel der Arbeit.....	33
2. Material und Methoden.....	34
2.1. Patientenkollektiv	34
2.2. Präanalytik	35
2.3. HRD-Analyse mittels Myriad myChoice® CDx (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA)	36
2.4. HRD-Analyse mittels AmoyDx® HRD Focus Panel (AmoyDx, Xiamen, China)	37
2.5. Probengewinnung:	38
2.6. DNA-Extraktion und -Quantifizierung.....	38
2.7. Library Preparation (HANDLE-System)	39
2.8. Sequenzierung.....	44
2.9. Datenanalyse	45
2.10. Statistik	47
3. Ergebnisse	47
3.1. Patientenkollektiv und Präanalytik	47
3.2. DNA-Extraktion und -Quantifizierung.....	48
3.3. Sequenzierung.....	49
3.4. Vergleich von HRD-Status-Bewertung: AmoyDx® HRD Focus Panel vs. Myriad myChoice® CDx Assay	50
4. Diskussion	55
5. Literatur	60
Literature Cited.....	60

Abkürzungen

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ATM	Ataxia telangiectasia mutata
ATR	Ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related
BARD1	BRCA1-associated RING domain protein 1
BER	Base Excision Repair
Bp	Base Pair
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BRIP1	BRCA1-interacting protein 1
BRCA1	BReast CAncer gene 1, Breast cancer related antigen 1
BRCA2	BReast CAncer gene 2, Breast cancer related antigen 2
g-BRCA	germline BRCA
s-BRCA	somatic BRCA
t-BRCA	tumor BRCA
BRCAt	wildtyp BRCA
BRCAmut	mutation BRCA
CE-IVD	Conformité Européenne In-vitro-Diagnostika
CHK1/2	Checkpoint kinase
CDK12	Cyclin-Dependent Kinase 12
CHEK2	Checkpoint kinase 2
CNV	Copy Number Variation
DNA	Desoxyribonucleic acid

DSB	Double-Strand Break
EOC	Epithelial Ovarian Cancer
EMA	European Medicines Agency
EMSY	Embryonic Male Sterile Yellow
ENIGMA	Enhancing Neuro Imaging Genetics through Meta-Analysis
ERBB2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
ESMO	European Society for Medical Onkologie
EU	European Union
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
GIS	Genomic Instability Score
GSS	Genomic Scar Score.
H2AX	Histone 2A Variant X
HANDLE	Halo-Shape-ANnealing- und Defer-Ligation-Enrichment
HGSOC	High-Grade Serous Ovarian Carcinoma
HGEOC	High-Grade Endometrioid Ovarian Carcinoma
HR	Homologe Rekombination
HRR	Homologous recombination repair
HRD	Homologous Recombination Deficiency
HRP	Homologous recombination proficiency
Indel	InsertionDeletion
Kb	Kilobasepaare
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LOH	Loss of Heterozygosity

LST	Large-Scale Transcriptomics		
Mb	Megabasepaare		
MIP	Molecular-Inversion-Probe		
MMR	Mismatch Repair		
MRE11	Meiotic Recombination 11		
MRN	MRE11-Rad50-NBS1-Komplex		
NBN	Nibrin		
NCCN	National Comprehensive Cancer Network		
NER	Nucleotide Excision Repair		
NGS	Next-Generation Sequencing		
NHEJ	Non-homologous end joining		
NPA	Negative Percent Agreement		
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome 1		
NTC	no template control		
OP	Operationspräparat		
OPA	Overall Percent Agreement		
PALB2	Partner and localizer of BRCA2		
PARP	Polyadenosine diphosphate-ribose polymerase		
PCR	Polymerase Chain Reaction		
PE	Präoperatives Exzisionsmaterial		
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate3-Kinase Alpha	Catalytic	Subunit
PPA	Positive Percent Agreement		
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog		
QC	Quality Control		

RAD50	Radiation Sensitive 50
RPA	Replication Protein A
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STK11	Serine/threonine kinase 11
TAI	Telomeric Allelic Imbalance
TAT	Turnaround Time
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TNBC	Triple-negative breast cancer
TP53	Tumor protein 53
UID	unique molecular identifier
USA	United States of America
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersverteilung und altersspezifische Inzidenz bzw. Mortalität des Ovarialkazinoms in Österreich.....	14
Abbildung 2: Histopathologische Einteilung primärer Ovarialtumore	15
Abbildung 3: Charakteristika des Ovarialkarzinoms	17
Abbildung 4: DNA-Reparaturwege	19
Abbildung 5: genetische Veränderungen, die zu genomischen Narben führen. ...	20
Abbildung 6: Molekulare Merkmale von HGSOE	22
Abbildung 7: Zeitleiste der Poly-ADP-Ribose- Polymerase (PARP) Inhibitoren - Zulassungen.....	24
Abbildung 8: Nutzen von PARP-Inhibitoren in den wichtigsten klinischen Studien	26
Abbildung 9: Methoden zur Detektion von Homologer Rekombinationsdefizienz.	29
Abbildung 10: Abdeckung der studienrelevanten Gene der homologen Rekombinationsreparatur in den Panels verschiedener Anbieter	32
Abbildung 11: Testprinzip der HANDLE-Systemtechnologie	40
Abbildung 12: HANDLE- Verfahren Workflow Library Preparation	40
Abbildung 13: Indexsequenz für Primer	42
Abbildung 14: Fragmentgrößenbestimmung	43
Abbildung 15: Empfehlung Endkonzentration der Sequenzierungsbibliothek	44
Abbildung 16: Empfohlener Sequenzierer und Probenmenge pro Durchlauf	44
Abbildung 17: Qualitätskontrolle der Datenanalyse	45
Abbildung 18: Beurteilung der Qualitätskriterien der zwei durchgeführten NGS-Läufe	50
Abbildung 19: Vergleich der HRD-Ergebnisse.....	52
Abbildung 20: Pearson Korrelationskoeffizient.....	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: klinisch-pathologischen Merkmale des Patientenkollektivs	34
Tabelle 2: DNA aus FFPE Proben	39
Tabelle 3: Hybridisierung-Programm am Thermocycler.....	41
Tabelle 4: Extension-Ligation-Programm am Thermocycler	41
Tabelle 5: Exonuklease-Programm am Thermocycler	41
Tabelle 6: Exonuklease-Ansatz	42
Tabelle 7: Amplifikationsprogramm.....	42
Tabelle 8: Studienpopulation	48
Tabelle 9: DNA-Konzentration der Bibliotheken und Fragmentgrößen	49
Tabelle 10: Gegenüberstellung Ergebnisse (Score)	51
Tabelle 11: Darstellung der diskordanten Fälle.....	52
Tabelle 12: Übereinstimmung der BRCA 1/2 Mutationsanalysen	54

Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom, insbesondere das hochgradig seröse Ovarialkarzinom (HGSOC), stellt einen bedeutenden Teil der gynäkologischen Malignome dar und bleibt trotz seiner geringen Inzidenz eine tödliche Krankheit. Der Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur, der genetischen Variationen in essenziellen Rekombinationsgenen, allen voran BRCA1 und BRCA2, zugeschrieben wird, ist ein häufiges genetisches Merkmal von HGSOC. Homologe Rekombinationsdefizienz (HRD) führt zu genomischer Instabilität, die zur Entwicklung von Eierstockkrebs beiträgt. Die Entdeckung von Poly (ADP-Ribose) -Polymerase (PARP)-Inhibitoren als potenzielle therapeutische Wirkstoffe, die mithilfe von synthetischer Letalität defekte DNA-Reparaturwege abzielen, eröffnet eine vielversprechende Behandlungsoption für Patientinnen mit HGSOC, sowohl in Rezidiv- als auch bei Erstlinien-Behandlungen. HRD ist nun somit der erste phänotypisch definierte prädiktive Marker für die Therapie mit PARP-Inhibitoren bei Eierstockkrebs. Mehrere unterschiedliche PARP-Inhibitoren wurden bei Ovarialkarzinom bereits getestet, und haben sich als neue selektive Therapie für hochgradigen Eierstockkrebs erwiesen. Die Bewertung des HRD-Status, als entscheidender Faktor zur Optimierung der klinischen Vorteile von PARP-Inhibitoren, wurde mithilfe des Myriad myChoice® CDx Assays (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA) durchgeführt, der kostenintensiv ist und zentralisiert in den USA durchgeführt wird.

Um die Notwendigkeit einer kosteneffektiven und zeitnahen Alternative zu adressieren, untersuchte die vorliegende Arbeit die Leistung des kommerziell verfügbaren AmoyDx® HRD Focus Panel (AmoyDx, Xiamen, China), das entwickelt wurde, um HRD-positive Tumoren im Eierstockkrebs durch genomische Instabilität zu identifizieren. Ziel war es, die Machbarkeit und Zuverlässigkeit dieses Assays im Vergleich zu Myriad myChoice® CDx zu beurteilen und die Übereinstimmungsergebnisse mit bestehenden Studien zu vergleichen. Die Studienkohorte bestand aus 19 Patientinnen mit epithelalem Ovarialkarzinom (EOC), wobei 15 davon mit dem CE-IVD AmoyDx® HRD Focus Panel analysiert wurden. Die DNA, die aus formalinfixiertem Paraffineinbettungsgewebe (FFPE) extrahiert wurde, wurde nach der Sequenzierung mithilfe der AmoyDx® NGS Data

Analysis System-ANDAS-Software analysiert, um gezielt Varianten in den Genen BRCA1/2 zu identifizieren und den HRD-Status präzise zu bestimmen.

Der Assay zeigte eine Erfolgsrate von 78,9%. Bemerkenswerterweise wies das AmoyDx® HRD Focus Panel eine durchschnittliche Bearbeitungszeit (TAT) von 10 Tagen von der Testanforderung bis zu den verfügbaren Ergebnissen auf, deutlich kürzer als die TAT von Myriad myChoice® CDx Assay (19,79 Tage), die auf den langen Transportweg zurückzuführen ist. Die Übereinstimmungsanalyse ergab eine Gesamtübereinstimmung (OPA) von 86,67%, wobei der positive prädiktive Wert (PPA) bei 80% und der negative prädiktive Wert (NPA) bei 100% lagen. Die lineare Korrelation (Pearson-Korrelationskoeffizient) zwischen Myriad und AmoyDx Score betrug 0,93. Aktuelle Studien bestätigten diese Ergebnisse und zeigten die Leistungsfähigkeit des AmoyDx® HRD Focus Panels sowie hohe Übereinstimmung mit dem Myriad myChoice® CDx Assay.

Die Implementierung eines umfassenden internen Workflows für HRD-Tests ist entscheidend, um eine schnelle und genaue Bestimmung des HRD-Status bei HGSOc-Patientinnen zu gewährleisten. Die Kombination aus benutzerfreundlichem Betrieb, Kosteneffektivität und schneller TAT macht das AmoyDx® HRD Focus Panel zu einer geeigneten Wahl zur zuverlässigen Bestimmung des HRD-Status bei HGSOc-Patientinnen.

Abstract

Ovarian carcinoma, especially high-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC), constitutes a significant part of gynecological malignancies and remains a deadly disease despite its low incidence. The defect in homologous recombination repair, attributed to genetic variations in essential recombination genes, notably BRCA1 and BRCA2, is a common genetic feature of HGSOC. Homologous recombination deficiency (HRD) leads to genomic instability, contributing to ovarian cancer development. The discovery of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors as potential therapeutic agents targeting defective DNA repair pathways through synthetic lethality presents a promising treatment option for patients with HGSOC in both recurrence and first-line settings. HRD has now become the first phenotypically defined predictive marker for PARP inhibitor therapy in ovarian cancer. Several different PARP inhibitors have already been tested for ovarian carcinoma, proving to be a novel selective therapy for high-grade ovarian cancer. The evaluation of HRD status, a critical factor in optimizing the clinical benefits of PARP inhibitors, has been performed using the Myriad myChoice® CDx Assays (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA), which is cost-intensive and centralized in the USA.

To address the need for a cost-effective and timely alternative, the present study examined the performance of the commercially available AmoyDx® HRD Focus Panel (AmoyDx, Xiamen, China), designed to identify HRD-positive tumors in ovarian cancer through genomic instability. The aim was to assess the feasibility and reliability of this assay compared to Myriad myChoice® CDx and to compare concordance results with existing studies. The study cohort consisted of 19 patients with epithelial ovarian carcinoma (EOC), with 15 being analyzed using the CE-IVD AmoyDx® HRD Focus Panel. The DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE) was analyzed after sequencing using the AmoyDx® NGS Data Analysis System-ANDAS software to specifically identify variants in the BRCA1/2 genes and accurately determine the HRD status. The assay demonstrated a success rate of 78.9%. Notably, the AmoyDx® HRD Focus Panel exhibited an average turnaround time (TAT) of 10 days from test request to available results,

significantly shorter than Myriad myChoice® CDx Assay TAT of 19.79 days, attributed to the long transportation process. The concordance analysis revealed an overall percent agreement (OPA) of 86.67%, with a positive predictive value (PPA) of 80% and a negative predictive value (NPA) of 100%. The linear correlation (Pearson correlation coefficient) between Myriad and AmoyDx Score was 0.93. Recent studies have corroborated these findings, demonstrating the efficacy of the AmoyDx® HRD Focus Panel and high concordance with Myriad myChoice® CDx Assay.

The implementation of a comprehensive internal workflow for HRD testing is crucial to ensuring rapid and accurate determination of HRD status in HGSOC patients. The combination of user-friendly operation, cost-effectiveness, and fast TAT makes the AmoyDx® Focus Panel a suitable choice for reliable determination of HRD status in HGSOC patients.

1. Einleitung

1.1. Inzidenz, Prävalenz und Mortalität der Ovarialkarzinome

Ovarialkarzinome sind trotz ihres seltenen Auftretens nach wie vor die tödlichste Form der gynäkologischen Malignome (1). Weltweit lag 2020 die Inzidenz von Ovarialkarzinom bei 314000 und etwa 207000 Frauen sterben an dieser Krankheit. Es ist die 8. häufigste Krebsform sowie krebsbedingte Todesursache bei Frauen weltweit. Die Inzidenz variiert jedoch aufgrund genetischer, hormoneller, umweltbedingter und sozioökonomischer Faktoren stark zwischen verschiedenen Ländern und Bevölkerungsgruppen (2).

Die höchste Prävalenz dieser Erkrankung ist bei weißen Frauen zu beobachten. Danach folgen nicht-hispanischer Schwarze, Hispanics und Asiaten/Pazifische Insulaner in Bezug auf die Inzidenz nach ethnischer Zugehörigkeit. Das Risiko für Eierstockkrebs erhöht sich mit fortschreitendem Alter, wobei ein deutlicher Anstieg nach dem 50. Lebensjahr zu verzeichnen ist. Am häufigsten wird die Diagnose im Alter von 55 bis 64 Jahren gestellt (1).

Es ist bekannt, dass neben genetische Faktoren, die eine bedeutende Rolle bei der Vererbung des Risikos, Endometriose Patientinnen für die Entwicklung von EOC prädisponiert sind, insbesondere für die klarzelligen und endometroiden Subtypen, von denen bekannt ist, dass sie von endometroiden Läsionen herrühren. Es wird auch angenommen, dass modifizierbare Lebensstilfaktoren ebenfalls eine Rolle im Ovarialkarzinomrisiko spielen. Ein erhöhtes Risiko besteht für Frauen mit vielen Ovulationszyklen im Leben. Faktoren, die die Ovulationsrate verringern, senken das Lebenszeitrisiko dieser Krankheit. Frühe Menarche und späte Menopause könnten das Risiko erhöhen. Schwangerschaft, Stillen und hormonhaltige Kontrazeptiva mindern das Risiko. Verfahren zur Fruchtbarkeitsreduktion wie Tubenligatur mindern das Risiko, während Hormonersatztherapie in den Wechseljahren das Risiko erhöhen kann. Weitere mögliche Risikofaktoren sind Übergewicht, Diabetes, Rauchen (3).

In Österreich ist es die siebenhäufigste Krebsart der weiblichen Bevölkerung und macht ca. 3,4% der Tumore der Frauen aus. Im Jahr 2019 erkrankten 661 Frauen

an Ovarialkarzinom und 486 starben daran (5,2%). Die 1- und 5-jährigen Überlebensraten, veranschaulicht in **Abbildung 1**, betragen zuletzt 76 % (2017-2018) und 44 % (2012–2016). Die Prävalenz von Ovarialkarzinomen ist im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen niedrig. Die meisten Fälle werden erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, was die Überlebensraten negativ beeinflusst. In Österreich erhielt nahezu die Hälfte der betroffenen Frauen die Diagnose erst, als der Tumor bereits die Organbegrenzung überschritten hatte, und ein höheres Tumorstadium ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Allerdings sank in den letzten 10 Jahren die altersstandardisierte Rate der Neuerkrankungen von 16,7% auf 13,5%, jene der Sterblichkeit von 11,0% auf 9,6% (4).

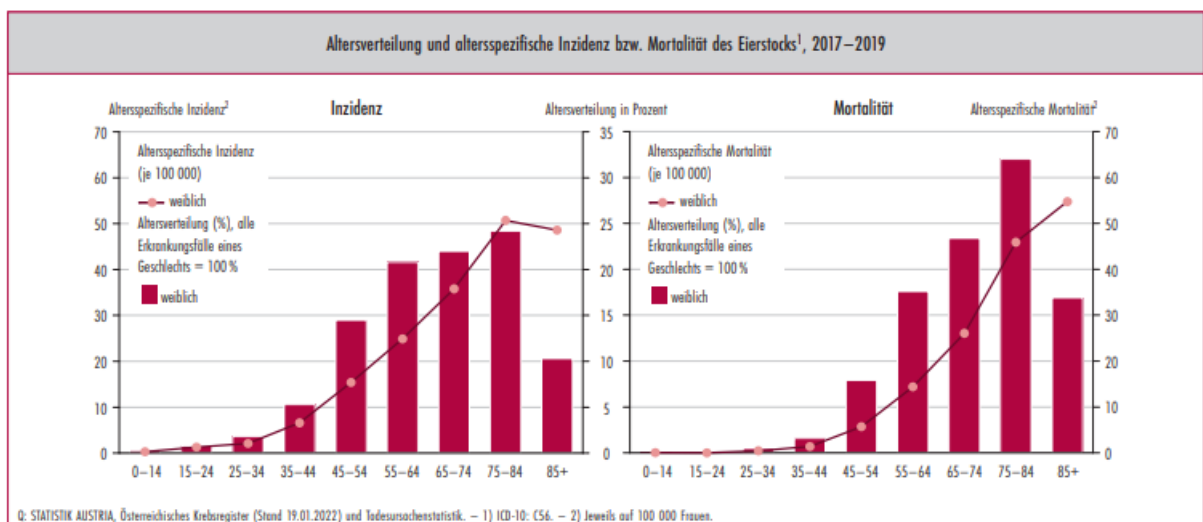


Abbildung 1: Altersverteilung und altersspezifische Inzidenz bzw. Mortalität des Ovarialkarzinoms in Österreich, 2017-2019 (4)

Die schlechte Langzeitüberlebensrate der Patientinnen mit Eierstockkrebs ist vorwiegend auf den symptomlosen Krankheitsverlauf und eine hohe Resistenzrate gegen die derzeitig verwendeten Chemotherapeutika zurückzuführen (5).

1.2. Subtypen des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom umfasst eine Reihe von Neoplasien mit unterschiedlichen klinisch-pathologischen und molekularen Merkmalen und Prognosen. Im Ovar

unterscheidet man histologisch aufgrund der drei verschiedene Gewebskomponenten nach der aktuell gültigen WHO-Klassifikation (6):

- Epitheliale Tumore
- Keimstrang-Stroma-Tumore
- Keimzelltumore

	Epitheliale Tumoren	Keimzelltumoren	Keimstrang-Stroma-Tumoren
Histogenese	Müller-Epithel (Oberflächenepithel)	Keimzellen	Stroma- und Keimstrangabkömmlinge
Häufigkeit	60–70 %	10–20 %	5–10 %
Typisches Alter	50 Jahre	0–25 Jahre	alle Altersklassen
Typen	<ul style="list-style-type: none"> • serös • muzinös • endometrioid • klarzellig • Brenner Tumor • seromuzinös 	<ul style="list-style-type: none"> • Teratom • Dysgerminom • Dottersacktumor • Chorionkarzinom 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrom • Granulosazelltumoren • Thekazelltumoren • Sertoli-Tumoren • Leydig-Tumoren

Abbildung 2: Histopathologische Einteilung primärer Ovarialtumore (6)

Mit ca. 60% stellen die epithelialen Tumore die größte Untergruppe aller Ovarialtumore dar. Beim epitheliale Ovarialkarzinom (EOC) handelt es sich um eine maligne Neoplasie des Oberflächenepithels (Müller-Epithel). Es gliedert sich, wie in **Abbildung 2** dargestellt, je nach Epitheltyp in die histologischen Subtypen, serös, muzinös, endometrioid, klarzellig, Brenner-Tumor, seromuzinös. Es wird angenommen, dass die serös differenzierten Karzinome ihren Ursprung vom Fimbrientrichter der Tube haben. Man vermutet maligne Transformationen im Tubenepithel bzw. im Bereich von Einschlusszysten, die vom Tubenepithel und nicht wie früher angenommen vom Oberflächenepithel des Ovars abstammen. Bei endometrioiden und klarzelligem Karzinomen scheint der Ursprung hingegen in

Endometrioseherden und bei muzinösen Karzinomen und den seltenen malignen Brennertumoren in den Walthardt'schen Epithelnestern, die aus Übergangsepithel bestehen, zu liegen (6).

In den letzten Jahren gab es intensive Forschungsbemühungen, um das Ovarialkarzinom aus molekularer und genetischer Sicht zu verstehen. Diese Anstrengungen haben zu einer grundlegenden Veränderung in der Klassifikation dieser Krankheit geführt.

Das von Kurman und Shih (7) vorgeschlagene dualistische Modell der Ovarialkarzinogenese wurde aufgrund seiner Relevanz und Bedeutung im Jahr 2014 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) offiziell in ihre aktualisierten Klassifikationsrichtlinien für Tumore des weiblichen Genitalsystems aufgenommen. Es ermöglicht eine molekularpathologisch basierte differenziertere Betrachtung der verschiedenen Tumorsubtypen und trägt zur Verbesserung der Diagnose und Behandlung dieser tödlichen gynäkologischen Krebserkrankung bei (7).

Nach diesem Modell der Ovarialkarzinogenese werden oberflächliche Epitheltumoren in zwei Hauptkategorien, veranschaulicht in **Abbildung 3**, Typ-I- und Typ-II-Tumoren, die unterschiedliche Entstehungswege aufweisen, eingeteilt. Zu den Typ-I Tumoren, die schrittweise aus Borderline-Tumoren hervorgehen, gehören die niedriggradigen serösen, endometroiden, muzinösen und klarzelligen Karzinome sowie maligne Brenner-Tumoren. Sie weisen lange einen indolenten Verlauf auf und sind mit ausgeprägten molekularen Veränderungen in KRAS, BRAF, PTEN, PIK3CA, ARID1A und ERBB2 -Genen assoziiert (8, 9, 7).

Typ-II Tumoren setzen sich aus hochgradigen serösen, endometroiden, undifferenzierten Karzinomen und Karzinosarkomen zusammen (8).

Die hochgradig serösen Karzinome (HGSCs) machen ~70% aller epithelialen Ovarialtumore aus. Diese schlecht differenzierten („high grade“) serösen Karzinome (HGSCs) sind im Vergleich zu den gut differenzierten („low grade“) serösen Karzinomen (LGSCs) aggressiv, treten typischerweise im fortgeschrittenen Stadium auf und sind somit für die hohe Mortalität verantwortlich (9).

Lediglich 13% der Fälle von serösem Ovarialkarzinom werden nach dem FIGO-Staging-System, welches auf dem Ausmaß der Erkrankung bei Diagnosestellung beruht, in Stadium I oder II erkannt (10).

Im Stadium I ist der Krebs auf die Ovarien oder Tuben beschränkt. Im Stadium II hat sich die Erkrankung bereits auf andere Beckenorgane, wie den Uterus, ausgebreitet. Die überwiegende Mehrheit der HGSOE wird im fortgeschrittenen Stadium (FIGO-Stadium III-IV) festgestellt. Im Stadium III erfolgt eine Ausdehnung des Ovarialkarzinoms über das Becken hinaus auf Organe oder Gewebe innerhalb der Peritonealhöhle oder auf die retroperitonealen Lymphknoten. Das Stadium IV resultiert aus einer Ausdehnung über die Peritonealhöhle hinaus, einschließlich der Lunge, und einer Beteiligung der inguinalen und anderen extraabdominalen Lymphknoten (11).

HGSOE sind vor allem durch pathogene Varianten in TP53 und genomische Instabilität gekennzeichnet. Diese sind auf Defekte in Signalwegen zurückzuführen, die an der DNA-Reparatur beteiligt (vor allem BRCA1 und BRCA2) sind (12, 7).

	Typ I	Typ II
Entstehungsort	Ovar, häufig aus Borderline-Tumoren oder Adenofibromen	Tube (Vorläufer oft STIC = seröses tubares intraepitheliales Karzinom), Ovar (de novo Entstehung)
Entstehungszeitraum	Lange	Rasch
FIGO Stadium	I	III-IV
Histologische Subtypen	Low-grade serös Low-grade endometrioid Klarzellig Muzinös Übergangszellig	High-grade serös High-grade endometrioid Karzinoid Undifferenziert
Familiäre Disposition	Nein	Ja
Mutationen	BRAF KRAS PTEN ARID1A ERBB2 PIK3CA	P53 BRCA 1 BRCA 2
Genetische Stabilität	Ja	Nein
Differenzierung	G1/G2	G3
Klinische Symptomatik	Lange indolent	Aggressiver Verlauf
Sensitivität auf Platin-haltige Chemotherapie	Gering bis mittel	Hoch
Wirksamkeit von PARP*-Inhibitoren	Nicht gegeben	Gegeben
Hormonsensitivität	Hoch bis mittel	Niedrig
Prognose	Günstig	Ungünstig

*PARP = Poly-ADP-Ribose Polymerase

Abbildung 3: Molekulare, histopathologische und klinische Charakteristika der Typen I und II des Ovarialkarzinoms (8)

1.3. Homologe Rekombinations-Defizienz (HRD)

Homologe Rekombinations-Reparatur (HRR) ist ein präziser Reparaturmechanismus, dargestellt in **Abbildung 4**, zur Behandlung von DNA-Doppelstrangbrüche (DSB). DSB können auf verschiedene Weise entstehen, entweder durch interne zelluläre Prozesse, ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika. Diese Art von Schädigung kann zu umfangreichen Veränderungen der Chromosomenstruktur führen und den programmierten Zelltod, die Apoptose, auslösen (13).

HRR tritt hauptsächlich auf, wenn sich Zellen in die S- und G2-Phasen befinden, da Cyclin-abhängige Kinasen gebraucht werden, um die Endresektion zu fördern und die HRR zu initiieren. Es stellt eine konservative Methode dar, bei der die ursprüngliche DNA-Sequenz an der beschädigten Stelle wiederhergestellt wird. Zunächst wird die DNA-Läsion durch den MRE11-RAD50-NBS1 (MRN)-Komplex erkannt, der die ATM-Kinase (Ataxia teleangiectasia mutated) aktiviert. Das 5'-Ende der DNA wird reseziert, und das Replikationsprotein (RPA) umhüllt die entstandenen einzelsträngigen DNA-Regionen, wodurch die ATR-Kinase (Ataxia teleangiectasia and Rad3-related) aktiviert wird. In der nächsten Phase wird RPA durch den Austausch mit dem reparaturassoziierten Protein RAD51, das durch weitere Partnerproteine wie CHEK51, BRCA2, BRCA1 und PALB2 beladen ist, ersetzt. Der defekte DNA-Strang bindet dann an sein Schwesterchromatid, das als Vorlage für die Neusynthese von DNA dient (14).

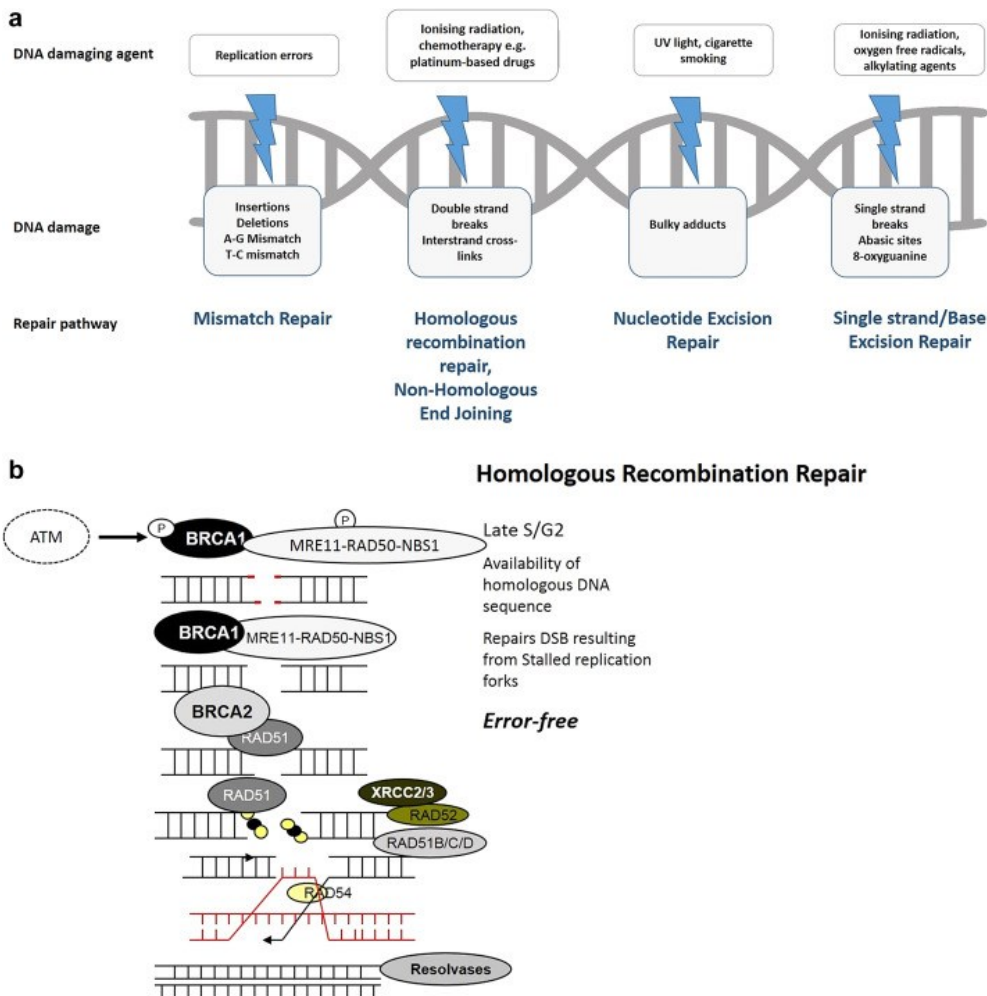


Abbildung 4: a: Die fünf DNA-Reparaturwege . b: DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur durch homologe Rekombinationsreparatur. (15)

In Zellen, in denen HRR nicht funktioniert, beispielsweise aufgrund eines Mangels an BRCA1 oder BRCA2, werden alternative Signalwege aktiviert, um DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren. Einer dieser Signalwege ist der nicht-homologe End-Joining-Signalweg (NHEJ). Dieser fehleranfällige alternative Reparaturweg ist während des gesamten Zellzyklus aktiv. Im Gegensatz zu HRR repariert die NHEJ die DSBs direkt, indem sie die Enden zusammenfügt, ohne dass eine identische DNA-Sequenz als Vorlage benötigt wird. Dieser fehlerbehaftete Mechanismus führt zu genomischer Instabilität, die sich in unterschiedlich großen genetischen Veränderungen, wie in **Abbildung 5** dargestellt, äußert. Dazu gehören spezifische Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), Insertionen und Deletionen (zusammenfassend als Indels bezeichnet, bis zu 1 kb groß), begleitet von kurzen Tandemwiederholungen und überlappenden Mikrohomologien (kurze, identische

Sequenzabschnitte an den Bruchpunkten der DNA) sowie Kopienzahlveränderungen (CNVs). Es treten auch größere Umlagerungen auf, darunter der Verlust der Heterozygotie (LOH), das telomerallelische Ungleichgewicht (TAI) und großflächige Zustandsänderungen (LST), die zusammen als "genomische Narben" bezeichnet werden. LOH tritt auf, wenn ein ganzes Allel aufgrund einer fehlerhaften DNA-Reparatur (z. B. durch ein größeres Indel) verloren geht, während TAI und LST den Verlust größerer Chromosomenregionen ($\geq 10\text{--}15$ mb) umfassen. Die genomische Instabilität und die Muster der genomischen Narben sind spezifisch für den beeinträchtigten DNA-Reparaturweg (HRD) (16, 17).

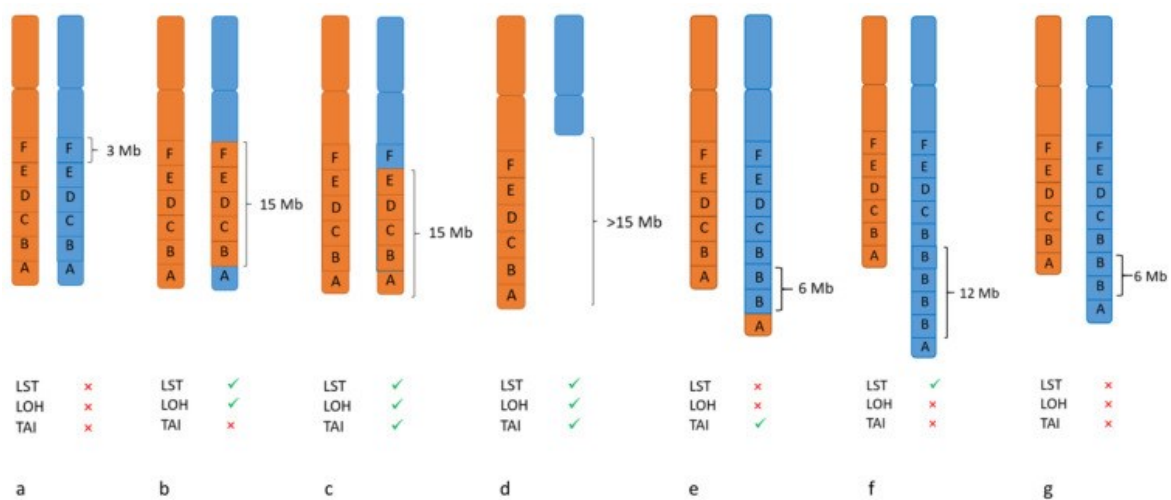


Abbildung 5: „Beispiele für verschiedene Veränderungen, die zu genomischen Narben führen. (a) Normales Chromosomenmuster mit mütterlichen und väterlichen Allelen (A–F); Jedes Kästchen steht für 3 mb. (b–g) Veränderungen wie Umlagerungen, Verlust oder Zugewinn von Chromosomenmaterial, die zu positiven Werten für LOH (Verlust der Heterozygotie), LST (großräumige Zustandsübergänge) und TAI (Telomer-Allel-Ungleichgewicht) führen können.“ (18).

1.4. Homologe Rekombinations-Defizienz als häufiges Merkmal der hochgradig serösen Ovarialkarzinome

Das epitheliale Ovarialkarzinom (EOC) zeichnet sich durch genetische Heterogenität aus. Chromosomale Instabilität und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kommen bei HGSOCS häufig vor. Im Allgemeinen kann die Ätiologie der HRD auf Keimbahn- oder somatische BRCA-Mutationen, epigenetisches Silencing sowie Mutationen von Genen, die am HR-Signalweg beteiligt sind, zurückgeführt werden. Keimbahn- oder somatische Mutationen in den

Genen BRCA1 und BRCA2 sind die am besten charakterisierten Ursachen für HRD bei HGSOE. Etwa 14-15 % aller Ovarialkarzinome insgesamt und bis zu 22,6 % der HGSOEs weisen BRCA1- oder BRCA2-Mutationen in der Keimbahn auf. Seltener, in etwa 6-7% der hochgradigen serösen Eierstockkarzinome, werden somatische BRCA1- und BRCA2-Mutationen gefunden. Interessanterweise wurden BRCA1-Mutationen häufiger beobachtet als BRCA2-Mutationen. In den meisten Fällen (81 % der BRCA1- und 72 % der BRCA2-Mutationen) gehen diese Mutationen mit einem sogenannten heterozygoten Verlust einher, was bedeutet, dass beide Allele inaktiviert sind (19).

Diese Mutationen im BRCA1/2-Gen sind hauptsächlich Frameshift-Insertionen oder -Deletionen, während Missense-Mutationen selten sind. Die Mutationen können in verschiedenen funktionellen Bereichen der Gene BRCA1 und BRCA2 auftreten (20).

Zusätzlich zu den genetischen Veränderungen kann die Inaktivierung von BRCA1 auch durch epigenetisches Silencing verursacht werden, indem der Promotor des BRCA1-Gens übermäßig methyliert wird. Etwa 10-20 % der HGSOEs zeigen dieses epigenetische Silencing von BRCA1, und es scheint, dass die Mutationen und die epigenetische Inaktivierung von BRCA1 sich gegenseitig ausschließen. Neben BRCA 1/2 wurden Mutationen in anderen Genen im HR-Signalweg, veranschaulicht in **Abbildung 6**, identifiziert, einschließlich RAD51B/C/D, PALB2, ATM, H2AX, CHK1/2, CDK12, NBN, MRE11, RPA, BRIP1, BARD1, RAD51, Fanconi-Anämie Gene, PTEN und EMSY ,die zum Auftreten eines „BRCAness“-Phänotyp führen können (d. h. eine defekte HR ohne BRCA1/2-Mutationen) (19, 21, 22, 23).

Insgesamt weisen mehr als 50 % HGSOE-Fälle einen Defekt im homologen Rekombinations-DNA-Reparaturweg (HRR) auf (19).

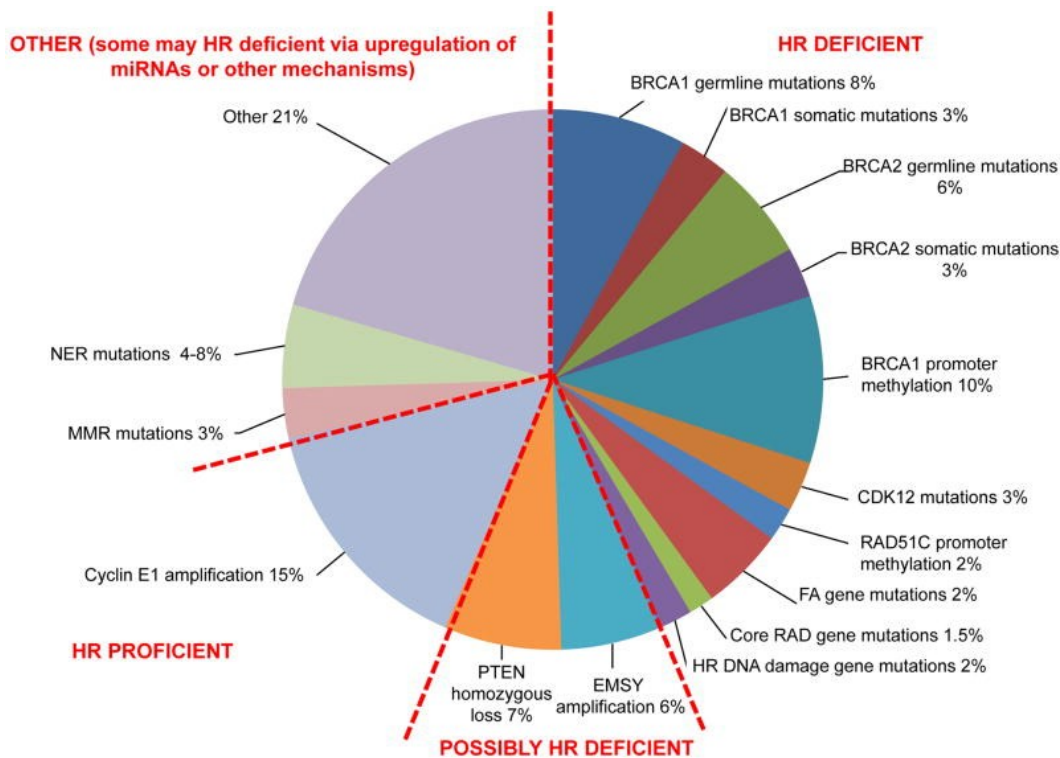


Abbildung 6: Molekulare (genetische und epigenetische) Merkmale von HGSOc (24)

1.5. Zielgerichtete Therapie mit Poly-ADP-Ribose- Polymerase-Inhibitoren

Die Hauptpfeiler der Behandlung von Ovarialkarzinomen bestehen nach wie vor aus der optimalen chirurgischen Intervention und der Anwendung von platinbasierter Chemotherapie. Die Entscheidung für die passende Therapie hängt von Tumorstadium der Krankheit sowie der biologischen Beschaffenheit des Tumors ab. Allerdings werden die meisten Fälle erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt, was selbst bei optimaler Behandlung die Prognose einschränkt (15).

Neben der zytoreduktiven Operation und Chemotherapie haben sich Poly-ADP-Ribose- Polymerase (PARP) Inhibitoren als eine wichtige Säule der Therapie von Ovarialkarzinomen entwickelt. HGSOc's mit einem Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur (HRD) zeigen einen deutlichen klinischen Phänotyp, der ein besonders gutes Ansprechen auf Chemotherapien mit Platinsalzen und eine Empfindlichkeit gegenüber PARP-Inhibitoren umfasst (25).

PARP-Inhibitoren sind pharmakologische Substanzen, die das Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) hemmen. PARP ist ein wichtiges Enzym bei der Reparatur von DNA-Schäden, insbesondere einzelsträngigen DNA-Brüchen. Die Funktion von PARP besteht darin, an DNA-Bruchstellen zu binden und Rekrutierung weiterer Reparaturproteine zu ermöglichen. Die Hemmung von PARP durch PARP-Inhibitoren führt zu einer Blockierung der DNA-Reparaturmechanismen, insbesondere der sogenannten Basisexzisionsreparatur (BER) und der homologen Rekombination (HR). In Anwesenheit von PARP-Inhibitoren werden einzelsträngige DNA-Brüche nicht effizient repariert. Dadurch kommt es zum Kollaps der Replikationsgabel und zur Bildung von doppelsträngigen DNA-Brüchen. Da BRCA-defiziente Tumorzellen bereits eine gestörte homologe Rekombinationsreparatur aufweisen, sind sie nicht in der Lage, diese doppelsträngigen Brüche effektiv zu reparieren. Zellen, denen entweder die homologe Rekombination (HR) fehlt, behalten ihre Lebensfähigkeit, während Zellen, denen sowohl BRCA-Mangel als auch PARP-Hemmung fehlt, einen synthetisch tödlichen Zelltod erleiden. Die gezielte Hemmung von PARP mit PARP-Inhibitoren hat sich als vielversprechende Therapieoption in der Krebsbehandlung erwiesen. Die Induktion einer synthetischen Letalität durch PARP-Inhibitoren ermöglicht eine selektive Tötung von Tumorzellen mit spezifischen DNA-Reparaturdefekten und bietet neue Möglichkeiten zur gezielten Krebstherapie (26).

Die Integration von PARP-Inhibitoren (PARPi) in die Erstlinien-Chemotherapie von Frauen mit platinempfindlichem Eierstockkrebs hat zu verbesserten klinischen Ergebnissen sowohl hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens als auch des Gesamtüberlebens geführt. In mehreren hochwertigen klinischen Studien zu PARP-Inhibitoren in der Erstlinien- als auch in der Rezidivtherapie, dargestellt in **Abbildung 7 und 8**, als Monotherapie oder als Kombinationstherapie, konnte der Nutzen der PARPi-Behandlung gezeigt werden.

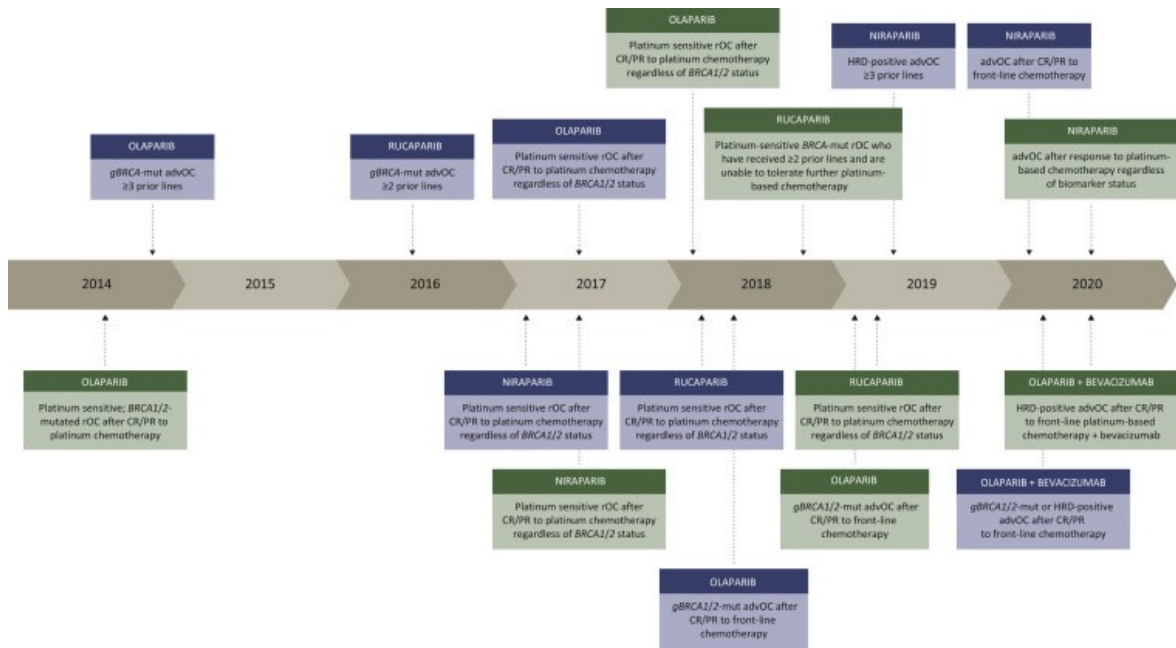


Abbildung 7: Zeitleiste der Poly-ADP-Ribose-Polymerase Inhibitoren -Zulassungen der US Food and Drug Administration (blau) und der die Europäische Arzneimittelagentur (grün) (22).

Olaparib (Lynparza®) zeigte als erster PARP-Inhibitor beeindruckende klinische Ergebnisse bei Patienten mit BRCA-Mutationen, sowohl als Behandlung bei rezidivierender Erkrankung als auch als Erhaltungstherapie zur Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und wurde 2014 von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung von fortgeschrittenem Eierstockkrebs mit pathogener oder wahrscheinlich pathogener BRCA1/2-Mutation zugelassen. Es zeigte eine objektive Ansprechrate von 34 % und eine mediane Ansprechdauer von 7,9 Monaten (27–29, 15).

Rucaparib (Rubraca®) wurde ähnlich für die Behandlung von BRCA-mutiertem rezidivierendem Eierstockkarzinom aufgrund der Ergebnisse der Studie ARIEL zugelassen und zeigte eine Ansprechrate von 59,5 % und eine mediane Ansprechdauer von 7,8 Monaten (30, 31).

Weiterentwicklungen bei der Anwendung von PARP-Inhibitoren haben gezeigt, dass die Platinsensitivität ein Indikator für die Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren ist und die Gruppe der Patienten, die davon profitieren, erweitert.

Als platin sensitiv gilt ein Rezidiv, wenn es frühestens 6 Monate nach Abschluss einer platinbasierten Therapie auftritt (8).

In den randomisierten Studien SOLO1 (32), PRIMA (33), PAOLA-1 (34) und VELIA (35) wurde die Wirksamkeit der PARPi als Erstlinienerhaltungstherapie unter Beweis gestellt. Die Therapie mit PARPi erzielte bei Patientinnen mit platin sensitiven, rezidivierendem Ovarialkarzinom einen bedeutenden Nutzen für das progressionsfrei Überleben.

Bei SOLO1 (32) Studie wurde die Wirkung von Olaparib als Erhaltungstherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem primärem BRCA1/2-mutiertem Ovarialkarzinom nach Operation und adjuvanter Chemotherapie untersucht. Eine signifikante Verbesserung des medianen progressionsfreien Überlebens von 56 Monaten eine 70%ige Reduktion des Krankheitsverlaufs konnte festgestellt werden. Die Anwendung von Olaparib als Erhaltungstherapie bei BRCA1/2- mutierten Patientinnen wurde schließlich 2018 von der FDA zugelassen (32).

In der PRIMA-Studie (33) mit Niraparib (Zejula®) wurden Patientinnen mit neu diagnostiziertem fortgeschrittenem Eierstockkrebs unabhängig von ihrem BRCA-Status aufgenommen. Es wurde ein großer Nutzen für das progressionsfreie Überleben im Vergleich zu Placebo in der Gesamtbevölkerung festgestellt. Besonders in der Untergruppe der HRD-positiven Patientinnen war der Benefit des progressionsfreien Überlebens noch ausgeprägter. Dies führte 2020 zur Zulassung von Niraparib als Erhaltungstherapie (33).

VELIA (35), eine Phase-3- Studie, stellte den Nutzen von einem weiteren PARP-Inhibitor Veliparib (ABT-888) unter Beweis.

Die PAOLA-1-Studie (34) untersuchte die Kombination von Olaparib und Bevacizumab (Avastin®) als Erhaltungstherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom, unabhängig von ihrem BRCA-Mutationsstatus, nach Erstlinienbehandlung mit Bevacizumab, einem anti-angiogenem Wirkstoff, der auf den VEGF-Rezeptor und verwandte Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) abzielt. Die Ergebnisse der PAOLA-1- Studie zeigten, dass diese Kombination das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation signifikant verbesserte. Die Ergebnisse bestätigten, dass Olaparib und Bevacizumab bei den Patientinnen im Vergleich zu Placebo und Bevacizumab zu einer signifikanten Verbesserung des

progressionsfreien Überlebens führten. Das mediane progressionsfreie Überleben betrug 22,1 Monate in der Olaparib-Gruppe und 16,6 Monate in der Placebo-Gruppe. Die vorsezifizierte Subgruppenanalysen zeigten, dass Patientinnen mit s-BRCA-Mutationen und solche mit positivem HRD-Status (einschließlich g/s-BRCA-mutierter Tumoren) den größten Nutzen in Bezug auf das progressionsfreie Überleben hatten. Hingegen wurde bei Patientinnen mit HRD-negativen Tumoren kein statistisch signifikanter Nutzen beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse hat die FDA die Zulassung dieser Kombination für Patientinnen mit HRD-positiven Tumoren erteilt (34).

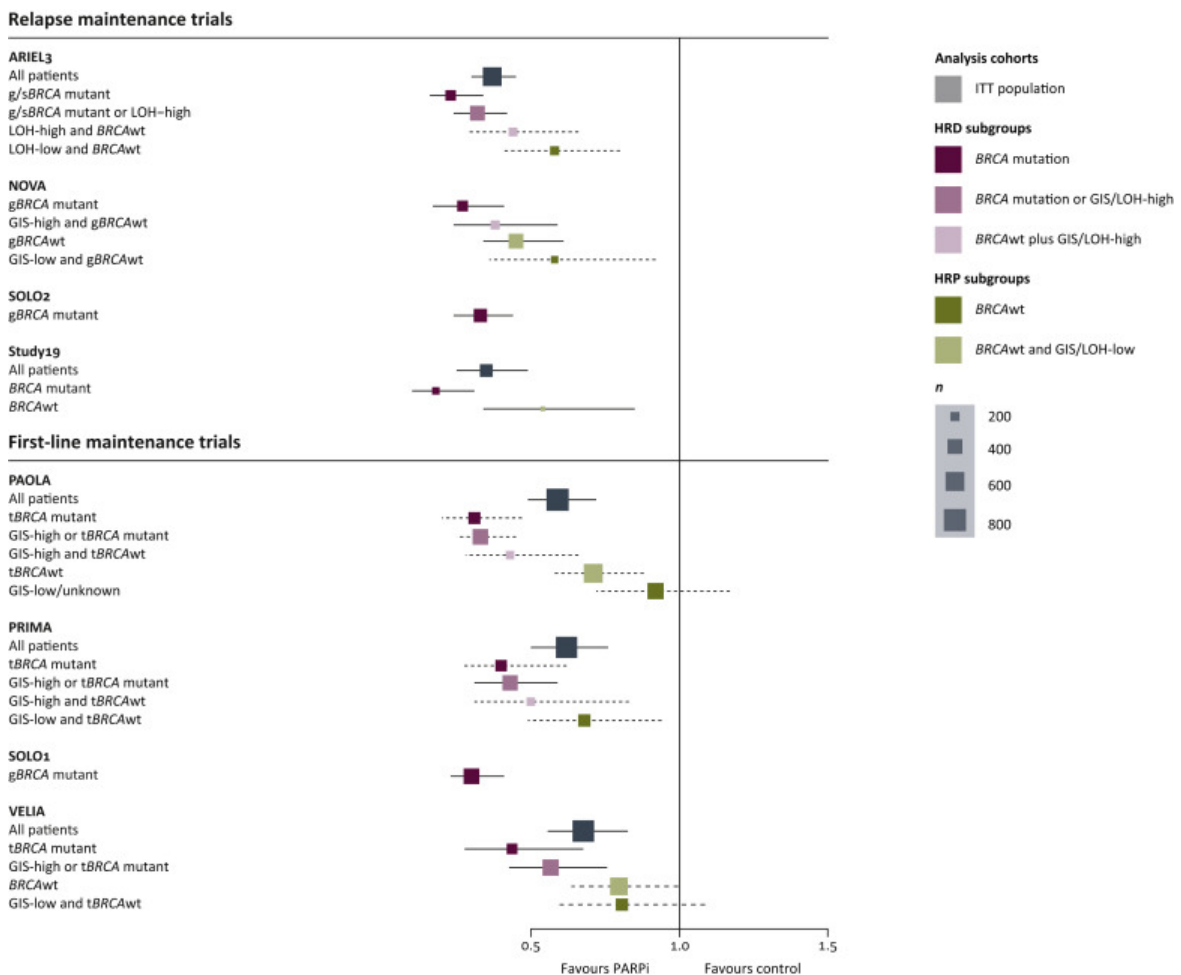


Abbildung 8: „Nutzen von PARP-Inhibitoren in den wichtigsten klinischen Phase-II/III-Studien zu hochgradigem Ovarialkarzinoms. Das Diagramm zeigt die Hazard Ratios und 95%-Konfidenzintervalle. Die Größe der Kästchen repräsentiert die Anzahl der Patienten (n). Durchgehende und gestrichelte Fehlerbalken zeigen primäre bzw. explorative Analysen an. Es sind ähnliche Trends in Bezug auf den Nutzen von PARP-Inhibitoren in HRD- und HRP-Untergruppen (Homolog Recombination Proficient) zu beobachten. Der größte Nutzen wird in der BRCA-Mutationskohorte beobachtet, die durch die Präfixe s, t und g (s

= somatisch, t = Tumor, g = Keimbahn) gekennzeichnet ist (dunkelviolett). Dies wird gefolgt von Patienten mit hohen genomischen Instabilitätswerten (GIS), LOH-Werten (Verlust der Heterozygotie) oder einer BRCA-Mutation (mittelviolett). Diese Untergruppen entsprechen den kommerziell als "HRD-positiv" klassifizierten Gruppen von Myriad Genetics und Foundation Medicine. Die BRCA-wt-Gruppe mit GIS/LOH-high wird in hellviolett dargestellt, gefolgt von der HRP-BRCA-wt-Gruppe in dunkelgrün und den BRCA-wt/GIS/LOH-low-Score-Untergruppen in hellgrün." (14)

Die Standardchemotherapie für Patientinnen mit hochgradig fortgeschrittenem epithelialen Ovarialkarzinom (HG-AOC) besteht derzeit aus Carboplatin und Paclitaxel. Anschließend wird eine Erhaltungstherapie durchgeführt, die entweder mit Bevacizumab, einem PARP-Inhibitor oder einer Kombination aus beiden erfolgt. Die Entscheidung für die Erhaltungstherapie basiert auf dem Vorhandensein einer homologen Rekombinationsdefizienz (HRD) und dem BRCA1/2-Status (36).

Gemäß den kürzlich veröffentlichten Konsensusempfehlungen der European Society for Medical Oncology (ESMO) wurde betont, dass die Bewertung des BRCA1/2-Status bei kürzlich diagnostizierten Patientinnen mit fortgeschrittenem Eierstockkrebs mit der Beurteilung des homologen Rekombinationsreparatur-Status (HRR) kombiniert werden sollte. Dieser Schritt ist entscheidend, um die effektive Anwendung von PARP-Inhibitoren auf eine größere Anzahl von Patienten auszudehnen (37).

Zu diesem Zweck steht bereits ein breites Spektrum an unterschiedlichen Assays zur Verfügung, um solche kombinierten HRD-Scores zu bestimmen. Nichtsdestotrotz erfordern alle Tests eine sorgfältige Validierung anhand klinischer Proben, um die Kriterien für ihre Etablierung als klinische Tests zu erfüllen (18).

Die Bestimmung des HRD-Status wurde in den schon erwähnten klinischen Studien PAOLA1, PRIMA, und VELIA mit dem von der FDA zugelassenen Myriad myChoice® CDx Assays (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA) durchgeführt, der den BRCA1- und BRCA2-Status sowie die HRD-induzierte genomische Narbe bewertet. Dieser Test ist allerdings mit hohen Kosten und Zeitaufwand bis zur Befunderstellung, da er zentral in der Firma Myriad Genetics durchgeführt wird, verbunden (38).

Eine umfassende Infrastruktur zur flächendeckenden HRR-Mangeltestung ist daher von entscheidender Bedeutung, um eine effektive Betreuung dieser Patienten zu gewährleisten (37).

Nach genomischen Assays werden Tumorproben als HRD positiv eingestuft, wenn sie einen BRCAmut tragen und/oder positiv für genomische Narben sind (d. h. genomischer Instabilitätswert über einem vordefinierten Schwellenwert) (12).

Die Definition dieses Schwellenwerts variiert jedoch zwischen den HRD-Assays und ist zum Teil nicht spezifisch angegeben, abhängig von den jeweiligen Herstellern.

1.6. Homologe Rekombinationsdefizienz (HRD) Test

Die derzeit in der klinischen Praxis oder in randomisierten klinischen Studien verwendeten HRD-Tests beschränken sich auf die Messung des Genotyps, der mit einem HRD-Phänotyp und einer defizienten homologe Rekombinationsreparatur korreliert. Sie messen jedoch nicht direkt die HRR selbst und können somit nur indirekt Krebserkrankungen mit HRD identifizieren. Dieser Tests dienen dazu, um Patienten zu identifizieren, die von PARPi (Poly(ADP-Ribose)Polymerase-Inhibitoren) profitieren. Somit steht hauptsächlich der klinische Nutzen von HRD-Tests im Zusammenhang mit der PARPi-Behandlungsstratifizierung im Vordergrund (14).

Es wurden verschiedene Testverfahren entwickelt, die als "HRD-Tests" bekannt sind, um genauer zu bestimmen, welche Krebsarten über die BRCA-Mutation hinaus wahrscheinlich an HRD leiden. Diese HRD-Tests, dargestellt in **Abbildung 9**, können in drei Hauptkategorien eingeteilt werden:

- Tests, die Gene identifizieren, die Bestandteile des HRR-Signalweg sind und so spezifische Ursachen für HRD erkennen können,
- Tests, die genomische "Narben" (GIS) oder Mutationsprofile messen, um die Muster somatischer Mutationen zu bestimmen unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache für HRD-, und
- Tests, die in der Lage sind, eine Echtzeit-HRR Funktionsstatuts zu liefern (14).

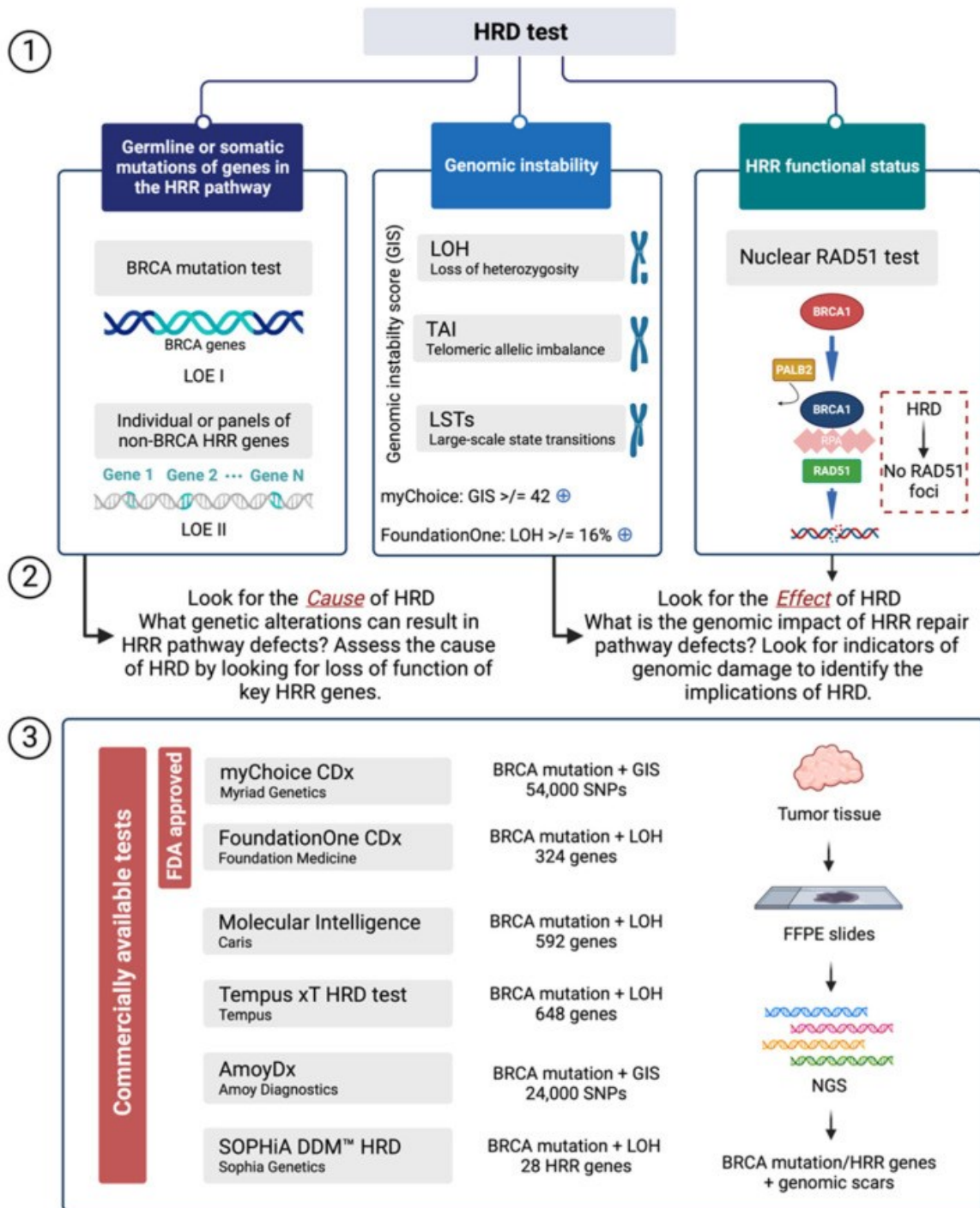


Abbildung 9: Methoden zur Detektion von Homologer Rekombinationsdefizienz (39)

Im Jahr 2012 wurden drei Assays entwickelt, die auf SNPs basieren und das Ausmaß chromosomaler Anomalien messen können. Diese Assays werden als "genomische Narben"-Assays bezeichnet und umfassen Telomer-Allel-Ungleichgewicht (TAI), Verlust der Heterozygotie (LOH) und Large-Scale-Transition (LST). Sie wurden ursprünglich mit Tumoren von BRCA1/2-mutierten Patienten entwickelt und dienen dazu, grobe genomische Veränderungen zu quantifizieren. In

einer computergestützten Analyse von Tumoren verschiedener Krebsarten im TCGA wurde festgestellt, dass Krebsarten, die Platin als Standard-Erstlinientherapie einsetzen, erhöhte genomische Narbenwerte aufweisen. Es wurden verschiedene kombinierte HRD-Scores vorgeschlagen, wobei der 3-Faktor-Kombinations-Narbentest Myriad myChoice® CDx Assays (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA) am meisten untersucht wurde. Die Leistung dieser kombinierten Scores, bestehend aus TAI, LOH und LST, wurde in einer Kohorte von Brustkrebstumoren mit BRCA-Mutationen untersucht und alle drei Scores waren signifikant mit einem BRCA-Mangel assoziiert. Ein kombinierter mittlerer HRD-Score wurde auch verwendet, um das Ansprechen auf eine Platintherapie bei dreifach negativem Brustkrebs vorherzusagen. Dieser Score wurde auch in der NOVA-Studie (40) mit dem PARP-Inhibitor Niraparib (Zejula®) bei Ovarialkarzinomen untersucht und zeigte einen statistisch signifikanten Nutzen für myChoice-positive Patienten. Unter den einzelnen Assays wurde nur der LOH-Test von FoundationOne® CD (Foundation Medicine, Cambridge, MA, USA) in der Phase-III-Studie ARIEL 3 prospektiv validiert (41).

Dieser Test analysiert den BRCA1/2-Status sowie den HRD-LOH-Score. Bei einem LOH-Score ≥ 16 wird die Probe als LOH high bezeichnet, bei einem Score < 16 als LOH low. Als HRD-positiv wird sie in diesem Assay bezeichnet, wenn entweder der BRCA1/2-Mutationstatus positiv ist und/oder ein LOH high vorliegt (42).

Die beiden Assays, von Myriad Genetics und Foundation Medicine, die BRCA-Mutation und GIS bzw. LOH kombinieren und wie bereits erwähnt in Studien zur Stratifizierung der Patienten herangezogen wurden, sind nicht frei kommerziell verfügbar. Beide Tests werden zentral von den Firmen durchgeführt. Die ersten bereits kommerziell verfügbaren NGS-basierten Panels zur Evaluierung von BRCA1/2-Mutationen und dem HRD Score sind das AmoyDx® HRD Focus Panel (AmoyDx, Xiamen, China) und das Oncomine™ Panel (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Der Oncomine™ Assay bewertet neben dem BRCA1/2-Status den LOH-Score. Das AmoyDx® HRD Focus Panel weist BRCA1/2-Mutation nach und ermittelt mittels zugehöriger Software AmoyDx® NGS Data Analysis System (ANDAS) den GS (Genomic Scar)-Score. Aber auch andere Hersteller erweitern ebenfalls ihre Genpanels in Richtung HRD-Testung. Derzeit wird die Genauigkeit verschiedene Assays, dargestellt in **Abbildung 10**, zur Bestimmung des HRD-

Status anhand von Konkordanzanalysen untersucht. Der Vergleich der Übereinstimmung alternativer Tests mit dem myChoice HRD-Score, dient der Findung von Alternativen zum Myriad myChoice® CDx Assays (43).

Panel	Anbieter	Fokus	Anzahl Gene
BROCA Cancer Risk Panel	UW Medical Center Laboratory Medicine – Genetics Lab, Seattle, WA, USA	Hereditäre Krebsprädisposition, inklusive Ovarial- und Brustkarzinome	74 Gene
BRCANext™	Ambry Genetics, Aliso Viejo, CA, USA	Hereditäre gynäkologische Karzinome und/oder Brustkarzinome	18 Gene
BRCANext-Expanded™	Ambry Genetics	Hereditäre gynäkologische Karzinome und/oder Brustkarzinome	23 Gene
CAN02	CeGaT GmbH, Tübingen, Deutschland	Brust- und Ovarialkarzinom	13 Gene
CAN21	CeGaT GmbH	Brust- und Ovarialkarzinom – erweitert	41 Gene
Myriad myRisk® Hereditary Cancer	Myriad Genetics, Inc., Salt Lake City, UT, USA	Hereditäre Krebsprädisposition, inklusive Ovarial- und Brustkarzinome	36 Gene
Oncomine BRCA Expanded Panel	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA	Ovarial-, Brust- und Prostatakarzinome	15 Gene
Oncomine HRR Pathway Predesigned Panel	Thermo Fisher Scientific Inc.	Homologe Rekombinationsreparaturgene plus zusätzliche Gene	28 Gene
Oncomine Comprehensive Plus	Thermo Fisher Scientific Inc.	Pan Cancer	500+ Gene
TrueSight Oncology 500	Illumina, San Diego, CA, USA	Pan Cancer	500+ Gene
Centobreast®	CENTOGENE GmbH, Rostock, Deutschland	Brust- und Ovarialkarzinom	30 Gene

Panel	Anbieter	Fokus	Anzahl Gene
Centocancer®	CENTOGENE GmbH	Pan Cancer	70 Gene
HANDLE HRR NGS Panel	AmoyDx, Xiamen, China	Homologe Rekombinationsreparaturgene plus zusätzliche Gene	32 Gene
Invitae Common Hereditary Cancers Panel	Invitae Corporation, San Francisco, CA, USA	Hereditäre Krebsprädisposition, inklusive Ovarial- und Brustkarzinome	47 Gene
FoundationOne® CD	Foundation Medicine, Cambridge, MA, USA	Pan Cancer	324 Gene
NeoTYPE® HRD+ Profile	NeoGenomics Laboratories, Inc., Fort Myers, FL, USA	Homologe Rekombinationsdefizienz/homologe Rekombinationsreparaturgene	30 Gene

Abbildung 10: Abdeckung der studienrelevanten Gene der homologen Rekombinationsreparatur (HRR) in den Panels verschiedener Anbieter (43)

1.7. Qualitätssicherung

European Society for Medical Oncology (ESMO) empfiehlt molekulare Laboratorien und Pathologieabteilungen bei der Durchführung von prädiktiven Biomarkertests für homologe Rekombinationsdefizienz Qualitätsstandards sowohl für die präanalytischen als auch für die analytischen Schritte einzuhalten, indem sie sich an nationale oder internationale Standards wie ISO 15189 oder gleichwertige Standards halten (10).

ISO 15189 legt die Anforderungen an die Qualität und Kompetenz von medizinischen Laboratorien fest und ist für die Gewährleistung zuverlässiger Testergebnisse von großer Bedeutung. Die Einhaltung dieser Norm ist daher ein wesentlicher Bestandteil der Qualitätssicherung in österreichischen Pathologien.

Eine wichtige Neuerung in der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika ist die Verpflichtung zur Verwendung von Produkten mit der Conformité Européenne (CE) Kennzeichnung, sofern diese für eine bestimmte Analyse oder Methode verfügbar sind. IVD-R basiert auf Qualitätsstandards aus der EN ISO 15189:2022 (D), weshalb die Akkreditierung angestrebt oder eine vollständige Umstellung auf IVD-CE-Tests erforderlich ist (44).

Die ÖNORM EN ISO 15189 wird weltweit als einheitlicher Standard für klinische oder medizinische Labors angesehen und wurde auch im österreichischen Normenwerk übernommen.

Insbesondere im Bereich der genetischen Untersuchungen sind reproduzierbare und robuste Ergebnisse von entscheidender Bedeutung, da sie die Grundlage für wirksame Therapien bilden. Falsch positive oder negative Ergebnisse können schwerwiegende Auswirkungen haben (45).

Vor allem die pathologische Beurteilung von Tumorgewebeproben zur Untersuchung somatischer molekularer Veränderungen ist unerlässlich. Seitens der ESMO wird empfohlen, dass ein erfahrener Pathologe mit Fachkenntnissen in der gynäkologischen Pathologie verantwortlich ist für die Bestätigung der Diagnose, die Bewertung der Probenqualität, die Auswahl des relevanten Tumoreals sowie die Quantifizierung von Tumorzellen, Entzündungszellen und Nekrosen. Die Erstellung eines integrierten pathologisch-molekularen Befundes wird dringend empfohlen (14).

1.8. Ziel der Arbeit

Diese Arbeit befasst sich mit der Machbarkeit eines lokal durchgeführten, kommerziell erhältlichen CE-IVD HRD-Tests. Ziel des Projekts ist die Implementierung des AmoyDx® HRD Focus Panel (AmoyDx, Xiamen, China) zur Bestimmung des HRD-Status, um reproduzierbare Ergebnisse mit maximaler Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Die Ergebnisse sollten eine hohe Konkordanz mit dem Standard Assay Myriad myChoice® CDx (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA) aufweisen. Das Endresultat der Konkordanzanalyse wird mit anderen veröffentlichten HRD-Studien verglichen. Aufgrund der Neueinführung

von HRD-Testmethoden in den letzten Jahren ist der Vergleich der Ergebnisse ein wertvoller Wissenszuwachs.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Für die Implementierung des AmoyDx® HRD Focus Panel (AmoyDx, Xiamen, China) wurde eine Kohorte von 19 Patientinnen, bei denen im Jahr 2021/22 an den Kliniken der oberösterreichischen Gesundheitsholding (Salzkammergut-Klinikum Vöcklabruck sowie Kepler Universitätsklinikum Linz) ein Ovarialkarzinom diagnostiziert wurde, herangezogen. Bei allen Patientinnen lagen bereits valide HRD-Ergebnisse, welche mittels Myriad MyChoice Assay ermittelt wurden, vor.

Patient	Alter	Histotyp	Entnahmeart	Lokalisation
ID_01	61	HGSOC	OP	Tube
ID_02	46	HGSOC	PE	Peritoneum
ID_03	63	HGSOC	OP	Adnexe
ID_04	75	HGEOC	OP	Adnexe
ID_05	59	HGSOC	OP	Adnexe
ID_06	76	HGSOC	PE	Portio
ID_07	64	Mucinöses OC	OP	Adnexe
ID_08	62	HGEOC	OP	Adnexe
ID_09	78	Adenocarcinom	OP	Dünndarm
ID_10	81	HGSOC	OP	Colon
ID_11	83	HGSOC	OP	Ovar
ID_12	64	HGSOC	OP	Uterus
ID_13	36	STIL/ STIC	OP	Uterus
ID_14	64	HGSOC	OP	Adnexe
ID_15	60	HGSOC	PE	Omentum
ID_16	66	HGSOC	OP	Uterus
ID_17	74	HGSOC	OP	Adnexe
ID_18	46	HGSOC	PE	gr. Netz
ID_19	70	HGEOC	OP	Adnexe

Tabelle 1: klinisch-pathologischen Merkmale des Patientenkollektivs. HGSOC: Hochgradiges seröses Karzinom; HGEOC: Hochgradiges Endometriumkarzinom; STIC: seröses tubuläres intraepitheliales Karzinom; STIL: seröse tubuläre intraepitheliale Läsion; PE: Biopsie

Die Auswahl des Patientenkollektivs beschränkte sich auf die vom Hersteller des AmoyDx® HRD Focus Panel empfohlenen und validierten Kriterien:

- Proben max. 1 Jahr alt,
- DNA-Input > 50 ng,
- Tumorgehalt > 30%

Die klinisch-pathologischen Merkmale der Patientinnen sind in **Tabelle 1** dargestellt. Das Alter der Patientinnen erstreckte sich von 36 bis 83, wobei das durchschnittliche Alter bei 64,6 Jahren lag. Die DNA aus FFPE-Gewebe wurde aus 15 (78,9%) chirurgischen Resektaten und aus 4 (21%) Gewebebiopsien extrahiert.

2.2. Präanalytik

Der Erfolg des HRD-Tests hängt entscheidend von der Kontrolle der präanalytischen Bedingungen von Tumorgewebeproben durch den Pathologen ab. Verzögerte Fixierung oder Überfixierung von Gewebeproben, kann die Qualität der Probe beeinträchtigen und sich auf die Ergebnisse der molekularen Tests auswirken. Für molekulare gewebebasierte HRD-Tests ist es von grundlegender Bedeutung, eine repräsentative Auswahl des Tumoreals zu treffen und den Anteil an malignen Zellen, Nekrosen und Entzündungskomponenten zu bestimmen. In der Regel wird empfohlen, dass mindestens 30 % des Gewebes aus Tumorzellen besteht, um den Nachweis von Varianten durch molekulare Techniken zu gewährleisten. Bei einigen Krebsarten mit HRD kann dies aufgrund zahlreicher entzündlicher Zellinfiltrate schwierig sein.

2.3. HRD-Analyse mittels Myriad myChoice® CDx (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA)

Myriad myChoice® CDx (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA) ist ein auf NGS basierender In-vitro-Diagnostiktest, der den qualitativen Nachweis und die Klassifizierung von SNV's, Insertionen und Deletionen und großen Rearrangement-Varianten in Protein-kodierenden Regionen und Intron/Exon-Grenzen der BRCA1- und BRCA2-Gene und die Bestimmung des Genomic Instability Score (GIS), der ein algorithmisches Maß für den Verlust von Heterozygotie (LOH), die telomere allelische Imbalance (TAI) und Large-Scale State Transitions (LST) unter Verwendung von DNA, die aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Tumorgewebeproben isoliert wurde. Der Test wird ausschließlich bei Myriad Genetic Laboratories, Inc., einem einzigen Laborstandort in 320 Wakara Way, Salt Lake City, UT 84108, durchgeführt werden (46).

Der Myriad myChoice® CDx -Test besteht aus den folgenden Hauptprozessen:

- Sammlung und Versand von Tumorproben an Myriad Genetic Laboratories, Inc, Salt Lake City (USA)
- Extraktion des tumorassoziierten genomischen DNA-Materials
- DNA-Verarbeitung unter Verwendung der folgenden Assays: myChoice® CDx Next Generation Sequencing wird verwendet, um Sequenzvarianten und genomische Umordnungen (z. B. große Deletionen und Duplikationen) in BRCA1 oder BRCA2 sowie die Analyse der genomischen Instabilität zu erkennen.
- Klassifizierung von Varianten in BRCA1 und BRCA2
- Berechnung des genomischen Instabilitätsscores (GIS)
- Ergebnisberichterstattung

Myriad stuft die Probe als HRD positiv ein, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- Pathogene oder wahrscheinlich pathogene Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 und/oder
- positiver genomischer Instabilitäts-Score (GIS- \geq 42)

Nach Abschluss des Tests bei Myriad wird ein Testbericht an den dafür bestimmten Arzt gesendet. Die Ergebnisse jedes Testkomponenten sowie die Interpretation der identifizierten BRCA1- und BRCA2-Varianten werden bereitgestellt. Falls mehrere Varianten entdeckt werden, basiert die Gesamtinterpretation des Tests, die für die Patientenbetreuung relevant ist, auf der schwerwiegendsten identifizierten Variante. Varianten, die als Polymorphismus oder vermuteter Polymorphismus klassifiziert wurden, sind nicht im Testbericht enthalten (46).

- Proben max. 1 Jahr alt,
- Tumorgehalt > 30%

2.4. HRD-Analyse mittels AmoyDx® HRD Focus Panel (AmoyDx, Xiamen, China)

Das AmoyDx® HRD Focus Panel (AmoyDx, Xiamen, China) umfasst eine 1,5 MB große Region des menschlichen Genoms und beinhaltet alle Exons von BRCA1/2 sowie 24.000 (24 k) Ziel-SNPs, die über das gesamte menschliche Genom verteilt sind. Die Sequenzdaten werden mithilfe einer speziellen Analysepipeline, der AmoyDx® NGS Data Analysis System-ANDAS-Software, verarbeitet, die darauf ausgerichtet ist, verschiedene Klassen genomischer Veränderungen präzise zu identifizieren, darunter Single-Nucleotide-Variationen (SNVs) und Indels in kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen mit einer Nachweisempfindlichkeit bei der Variantenallelfrequenz (VAF) von $\geq 5\%$. Der HRD-Score wird durch die Summe von drei verschiedenen genomisch instabilen Ereignissen berechnet, nämlich dem Verlust der Heterozygotie (LOH), dem telomerischen allelischen Ungleichgewicht (TAI) und dem großskaligen Zustandsübergang (LST). Gefundene Mutationen werden gemäß den Richtlinien des American College of Medical Genetics (ACMG) annotiert. Dieser Assay kann sowohl mit Gewebeproben als auch mit Liquid biopsies durchgeführt werden und basiert auf dem Halo-shape Annealing and Defer-Ligation Enrichment System, das eine verbesserte Version der Molecular Inversion Probe-Technologie ist. Dieses System ermöglicht eine präzise Auswahl der Zielregionen und trägt somit zur Genauigkeit und Effizienz des Assays bei (47, 39, 48).

Der Genomic Scar Score (GSS) des AmoyDx® HRD Focus Panel wurde anhand von 154 Ovarial- und Mammakarzinomen mit bekanntem BRCA1/2 Mutations- oder Methylierungsstatus ermittelt. Der GSS zeigt hohe Übereinstimmung mit dem biallelischen Verlust von BRCA. HRD-Positivität wird entweder durch das Vorhandensein einer pathogenen oder wahrscheinlich pathogenen BRCA1/2-Mutation und/oder einem HRD-Score von ≥ 50 festgelegt (49).

2.5. Probengewinnung:

Es wurden 4 bis 8 Schnitte, abhängig von der Tumorgröße, mit 9µm Dicke vom zu untersuchenden formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Tumorgewebeblöcken sowie ein HE-Schnitt angefertigt. Der HE-Schnitt wurde von PathologInnen beurteilt, die Tumorareale markiert sowie der Tumorgehalt bestimmt.

Es wurden 1-2 Schnitte (je max. 9 µm) mit sterilem Skalpell trocken oder nass vom Objektträger unter sterilen Bedingungen in ein 1,5 ml Tube überführt.

2.6. DNA-Extraktion und -Quantifizierung

Die DNA aus dem FFPE-Gewebe wurde mit dem AllPrep® DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Die Extraktion erfolgte laut Herstellerangaben und wurde am Extraktionsgerät QIAcube (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Nach Beenden der Extraktion enthielt jedes Tube ein 40µl Eluat. Die DNA-Quantifizierung der Eluate wurde mit dem Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) am Qubit® (Thermo Fisher Scientific) vorgenommen. Anschließend wurden die Proben, laut **Tabelle 2**, mit low Tris-EDTA-(TE) Puffer auf 12,5 ng/µL verdünnt. Die Eluate wurden entweder gleich für die Library Prep verwendet oder über Nacht bei -20°C gelagert.

Reagenz	Volumen
lowTE-Puffer	8 - X μ l
DNA	X μ l
Gesamtvolumen	8 μl

Tabelle 2: DNA aus FFPE-Proben: Das Volumen "X" sollte 50 - 100 ng DNA enthalten (100 ng empfohlen; entspricht einer Konzentration von 12,5 ng/ μ l bei 8 μ l)

2.7. Library Preparation (HANDLE-System)

Das Testprinzip verwendet die **Halo-Shape-ANnealing-** und **Defer-Ligation-Enrichment (HANDLE)**-Systemtechnologie, dargestellt in **Abbildung 11** und **12**, in Verbindung mit einer verbesserten Molecular-Inversion-Probe (MIP)-Technologie zur gezielten Erfassung der Zielgenregion. Um die Originalität zu gewährleisten, wird ein Unique Molecular Identifier (UID) an beiden Enden jedes DNA-Fragments eingeführt, um eine Rückverfolgung zum ursprünglichen Vorlagenstrang für mögliche Fehlerkorrekturen zu ermöglichen. Die verwendete Sonde besteht aus einem Verlängerungsarm und einem Ligationsarm, welche spezifisch zur Zielgenregion komplementär sind. Der Prozess beginnt damit, dass der Verlängerungsarm und der Ligationsarm an der Zielgenregion verankert werden und die DNA mithilfe der DNA-Polymerase vom Verlängerungsarm zum Ligationsarm erweitert wird. Daraufhin werden die Nickstellen mit der Ligase verbunden, um die Bildung kreisförmiger Produkte zu ermöglichen. Die überschüssigen linearen Sonden, einsträngige und doppelsträngige Nukleinsäuren werden mit der Exonuklease abgebaut. Abschließend wird eine universelle PCR-Amplifikation durchgeführt, um die Zielbibliotheken zu vermehren (49).

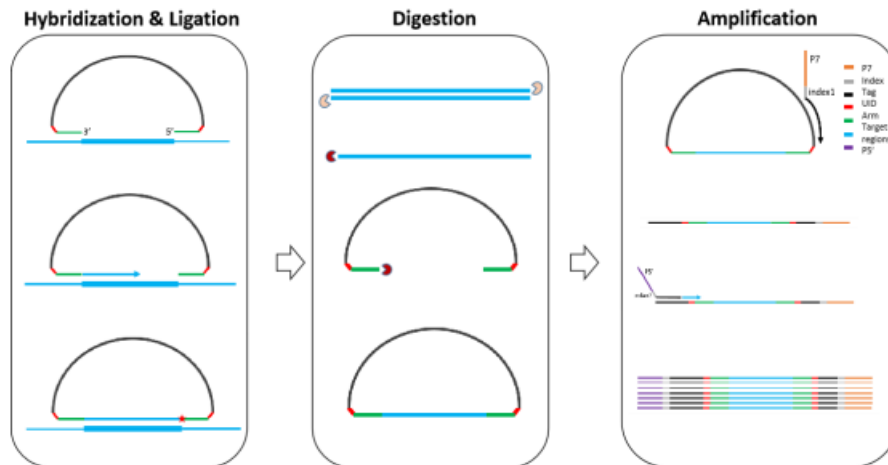


Abbildung 11: Testprinzip der **Halo-Shape-ANnealing- und Defer-Ligation-Enrichment (HANDLE)-Systemtechnologie** (49)

Die Library Preparation erfolgte entsprechend dem Protokoll AmoyDx® HRD Focus Panel. Es wurde für jede Library-Herstellung Positivkontrollen (PC A; im Kit enthalten; DNA-Konzentration je: 6 ng/μl) und eine Negativkontrolle (NTC) mitgeführt.

1	Hybridisierung	Zugabe von genom. DNA, Puffer, HS-Probes für die Hybridisierung	125 min
2	Extension - Ligation	Zugabe des HS-Extension-Ligation Master Mix; Erzeugung von zirkulären Produkten	10 min
3	Exonuklease Verdau	Zugabe von HS-Exonuklease A und B zur Entfernung nicht-zirkulärer DNA	40 min
4	PCR - Amplifikation	Zugabe von HS-PCR Master Mix, H ₂ O, HS-S5 und HS-N7 Primers zur Library Amplifikation	40 min
5	Aufreinigung	Aufreinigung über "Magnetic Beads"	40 min

Abbildung 12: **Halo-Shape-ANnealing- und Defer-Ligation-Enrichment (HANDLE)-Verfahren Workflow Library Preparation** (40)

a) Hybridisierung: Im ersten Schritt wurden HRD-Probe und HRD-Hybridization-Buffer gemeinsam mit Prädenaturierungsansatz (Proben-DNAs mit low TE-Puffer verdünnt auf 12,5 ng/μl) amplifiziert (**Tabelle 3**). Die Hybridisierungszeit betrug exakt 2 Stunden und durfte nicht überschritten werden.

<i>Reaktionsvolumen: 10 µl</i>		
Schritt	Temperatur	Zeit
1	95° C	5 min
2	60° C	2 h
3	4° C	∞

Tabelle 3: Hybridisierung-Programm am Thermocycler

b) Extension-Ligation: Danach erfolgte die Zugabe vom HRD-Extension Ligation Master Mix zum Hybridisierungsansatz. Dieser Schritt dient der Erzeugung von zirkulären Produkten (siehe **Tabelle 4**).

<i>Reaktionsvolumen: 11 µl</i>		
Schritt	Temperatur	Zeit
1	60° C	10 min
2	4° C	∞

Tabelle 4: Extension-Ligation-Programm am Thermocycler

c) Exonuklease-Verdau: Der Exonuklease-Schritt (**Tabelle 5**) erfolgte unmittelbar nachdem die Extension-Ligation. Die Zugabe von HRD-Exonuclease A und HRD-Exonuclease B zum Extension-Ligation-Ansatz diente der Entfernung nicht zirkulärer DNA.

<i>Reaktionsvolumen: 13,5 µl</i>		
Schritt	Temperatur	Zeit
1	37° C	30 min
2	95° C	10 min
3	4° C	∞

Tabelle 5: Exonuklease-Programm am Thermocycler

d) PCR-Amplifikation: Dem Exonuklease-Ansatz (**Tabelle 6**) wurden HRD-N7 Primer, HRD-S5 Primer und HRD-PCR Master Mix hinzugefügt und das Amplifikationsprogramm (**Tabelle 7**) gestartet.

Reagenz	Volumen
Exonuklease-Ansatz	13,5
HRD-PCR Master Mix	25 µl
Wasser (gereinigt, Nuklease-frei)	8,5 µl
HRD-N7 Primer	1,5 µl
HRD-S5 Primer	1,5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 6: Exonuklease-Ansatz

Reaktionsvolumen: 50 µl			
Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	98° C	30 s	1
2	98° C	10 s	21
	61° C	30 s	
	72° C	20 s	
3	72° C	5 min	1
	4° C	∞	1

Tabelle 7: Amplifikationsprogramm

Jeder der HRD-N7 und HRD-S5 Primer, veranschaulicht in **Abbildung 13**, besitzt eine Index-Sequenz. Es wurden unterschiedliche Kombination der Primer für jede Library-Probe verwendet. In einem Sequenzierlauf durften nicht zwei Libraries mit gleicher Primerkombination verwendet werden.

Index Sequenz Information für Primer

Name	Primer Index Information	Illumina Nextera XT v2 Set B No.
HRD-N716	TAGCGAGT	N716
HRD-N718	GTAGCTCC	N718
HRD-N719	TACTACGC	N719
HRD-N720	AGGCTCCG	N720
HRD-N721	GCAGCGTA	N721
HRD-N722	CTGCGCAT	N722
HRD-N723	GAGCGCTA	N723
HRD-N724	CGCTCAGT	N724
HRD-N726	GTCTTAGG	N726
HRD-N727	ACTGATCG	N727
HRD-N728	TAGCTGCA	N728
HRD-N729	GACGTCGA	N729

Name	Primer Index Information	Illumina Nextera XT v2 Set B No.
HRD-S502	CTCTCTAT	S502
HRD-S503	TATCCTCT	S503
HRD-S505	GTAAGGAG	S505
HRD-S506	ACTGCATA	S506
HRD-S507	AAGGAGTA	S507
HRD-S508	CTAAGCCT	S508
HRD-S510	CGTCTAAT	S510
HRD-S511	TCTCTCCG	S511

Abbildung 13: Indexsequenz für Primer (49)

e) Aufreinigung: Die Libraries wurden laut dem Protokoll mit AMPure XP Beads aufgereinigt und danach mit dem Qubit Fluorometer mittels Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) gemessen.

Die Library-Konzentration sollte > 20 ng/μl sein (entspricht > 113 nM).

Umrechnungsformel:

$$\text{Library-Konzentration [nM]} = \frac{\text{Library-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} \times 10^6}{660 \times 268}$$

Die Fragmentgröße, veranschaulicht in **Abbildung 14**, wurde mittels QIAxcel® DNA-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) am QIAxcel® Connect System (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

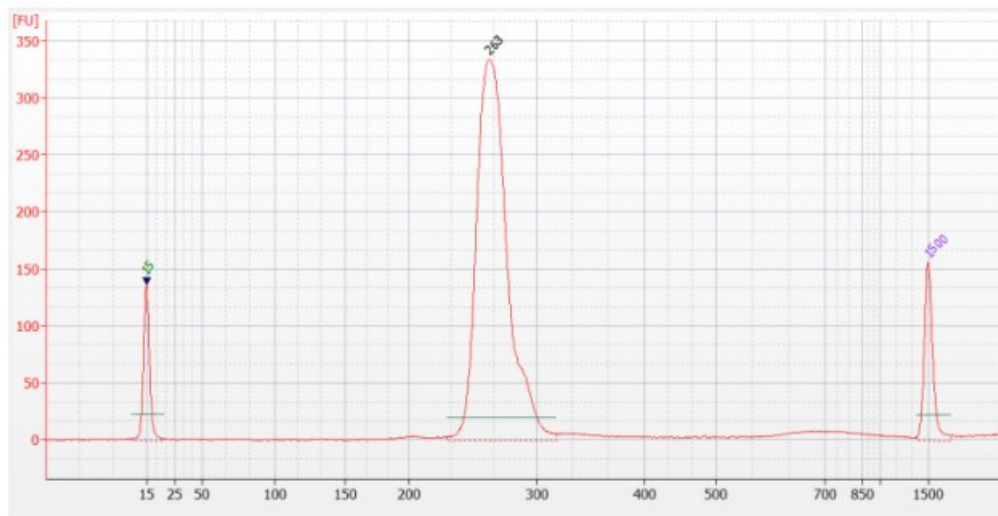


Abbildung 14: Fragmentgrößenbestimmung

Der Aufbau der DNA-Bibliothek im HANDLE-System nahm insgesamt 5 Stunden in Anspruch, wobei die manuelle Bearbeitungszeit 1 Stunde betrug.

2.8. Sequenzierung

Nach Abschluss einer Qualitätskontrolle (QC) unterzogen wir die vorbereiteten DNA-Bibliotheken einer Sequenzierung auf Illumina-Sequenzierplattform NextSeq550Dx.

Dazu wurden die quantifizierten Proben mit 10 mM TRIS-HCl auf 5 ng/μL verdünnt. Denaturierung und Verdünnung der Bibliotheken wurde gemäß den Anweisungen von Illumina NextSeq durchgeführt. Die empfohlene Endkonzentration der Sequenzierungsbibliothek wurde berechnet laut in **Abbildung 15** dargestellter Formel:

Illumina Sequencer	Final Concentration
NextSeq 500	0.6~0.8 pM
NovaSeq 6000	1~1.4 nM

Note: The concentration converting formula:

$$\text{Library Concentration [nM]} = \frac{\text{Library Concentration [ng/}\mu\text{L]} \times 10^6}{660 \times 268}$$

Abbildung 15: Empfehlung Endkonzentration der Sequenzierungsbibliothek

Sequencer	Flow Cell	Read Length	Sample Quantity/Run
NextSeq500	Mid	2×150 bp	10
	High	2×150 bp	30
NovaSeq 6000	SP	2×150 bp	62
	S1	2×150 bp	at least 96

Abbildung 16: Empfohlener Sequenzierer und Probenmenge pro Durchlauf

500 μL des Library Pools wurden anschließend in eine Mid Output oder High Output (siehe **Abbildung 16**) Cartridge geladen und am NextSeq™ 550Dx (Illumina, San Diego, CA, USA) sequenziert. Der empfohlene Prozentsatz für die Zugabe von Illumina PhiX Control v3 betrug 1%. Die Sequenzierungsdaten sollten pro FFPE-Probe oder HRD-Positive Control A nicht weniger als 4 Gb betragen. Die Proben wurden von beiden Seiten sequenziert (paired end).

2.9. Datenanalyse

Nach der Sequenzierung folgte das Demultiplexing der gleichzeitig sequenzierten Proben, indem die Indices den einzelnen Proben zugeordnet und dadurch FASTQ Files generiert wurden.

Die Sequenzierungsrohdaten wurden mithilfe der AmoyDx® NGS Data Analysis System-ANDAS-Software analysiert, um Varianten in den Genen BRCA1/2 zu identifizieren und den HRD-Status zu bestimmen.

QC parameter	QC standard (FFPE sample or HRD-Positive Control A)
Q30	$\geq 75\%$
Coverage	$\geq 98\%$
Uniformity (BRCA region)	$\geq 95\%$
Mean Effective Depth (BRCA region)	$\geq 400\times$
Uniformity (SNPs region)	$\geq 90\%$
Mean Effective Depth (SNPs region)	$\geq 200\times$

Abbildung 17: : Qualitätskontrolle der Datenanalyse (übernommen aus AmoyDx® HRD Focus Panel (Reversible Terminator Sequencing) Instruction for Use Version: B1.1) (49).

Um die Qualität des NGS-Laufes zu beurteilen, galten folgende Richtwerte (dargestellt in **Abbildung 17**):

- Q30 Score $\geq 75\%$ (Q30 Score = Eine Base Call von 1.000 wird als fehlerhaft vorhergesagt, was eine Base Call Genauigkeit von 99,9% bedeutet.)
- Coverage $\geq 98\%$ (Coverage = Durchschnittliche Anzahl der "abdeckenden" Reads einer bestimmten Zielregion.)
- Uniformity (BRCA region) $\geq 95\%$ (Die Uniformity der BRCA1- und BRCA2-Genregionen definiert den Anteil der Zielbereiche, in denen die Tiefe größer als 20% der durchschnittlichen Tiefe ist.)
- Mean Effective Depth (BRCA region) $\geq 400\times$ (Mean Effective Depth (BRCA region) = Der Durchschnitt der Tiefe aller einzelnen Basen der BRCA1- und BRCA2-Gene-Regionen nach Kalibrierung der einzelnen Basen.)

- Uniformity (SNPs region) $\geq 90\%$ (Die Uniformity der SNPs-Regionen definiert den Anteil der Zielbereiche, in denen die Tiefe größer als 20% der durchschnittlichen Tiefe ist.)
- Mean Effective Depth (SNPs region) $\geq 200x$ (Mean Effective Depth (SNPs region) = Der Durchschnitt der Tiefe aller einzelnen Basen der SNPs-Region nach Kalibrierung der einzelnen Basen) (49).

Dieser Assay ermöglichte die gleichzeitige Analyse von Einzelnukleotidvarianten (SNVs) und Insertionen/Deletionen (Indels) in den gesamten kodierenden Regionen und Exon-Intron-Grenzen von BRCA1 und BRCA2, wobei Veränderungen mit einer Allelfrequenz von mindestens 5% erfasst wurden. Zusätzlich wurde ein genomischer Narben-Score (GSS) basierend auf der Analyse von 24.000 SNPs geschätzt.

Die BRCA1/2-Varianten wurden gemäß dem American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) 5-Klassen-System (50) als pathogen, wahrscheinlich pathogen, Variante unbekannter Signifikanz, wahrscheinlich gutartig oder gutartig klassifiziert.

Ein HRD-positiver Befund wurde entweder durch das Vorliegen einer pathogenen BRCA1/2-Mutation, einer wahrscheinlich pathogenen Mutation oder einem HRD-Score von 50 oder höher definiert.

Positiv- und Negativkontrolle: Es wurde seitens des Herstellers empfohlen, im Prozess der Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung und Datenanalyse eine HRD-Positive Control A einzuschließen. Zusätzlich wurde bei der Bibliotheksvorbereitung eine No-Template Control (NTC) verwendet werden. Die NTC diente ausschließlich der Qualitätskontrolle des Bibliotheksaufbauprozesses und wurde nicht bei der Sequenzierung oder Datenanalyse mitgeführt.

2.10. Statistik

Die Auswertung erfolgte primär mittels deskriptiver Statistik in Excel. Eine Konkordanzanalyse zur Überprüfung der Übereinstimmung der Ergebnisse, die mittels AmoyDx HRD Focus Assay und myChoiceCDx-Assays von Myriad generiert wurden, wurde durchgeführt.

Für die Bewertung der Leistung des AmoyDx HRD Focus Panel im Vergleich zum Myriad MyChoice CDx wurden der Positive Percent Agreement (PPA), der Negative Percent Agreement (NPA) und der Overall Percent Agreement (OPA) berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv und Präanalytik

Ein Untersuchungskollektiv von 19 Patientinnen mit (siehe Tabelle 8) histologisch bestätigter Ovarialkarzinom-Diagnose sowie bereits vorliegendem Bericht mittels Myriad myChoice® CDx Assays (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA) wurde ausgewählt, um den HRD-Status mit dem AmoyDx® HRD Focus Panel (AmoyDx, Xiamen, China) zu vergleichen. Der Tumoranteil sowie die klinisch-pathologischen Merkmale der Patientinnen, deren Alter im Durchschnitt 64,6 Jahre betrug, sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die DNA wurde aus 78,9% chirurgischen Resektaten und 21% Gewebebiopsien extrahiert. Ein erfahrener Pathologe überprüfte jeden Gewebeschnitt und wählte die repräsentativsten Bereiche des Tumors aus, in denen der Prozentsatz der Tumorzellen über 30% lag. Eine Probe (ID_09) musste ausgeschlossen werden, da der Tumoranteil nur 10 % betrug.

Für das AmoyDx® HRD Focus Panel betrug die durchschnittliche Durchlaufzeit (TAT) von der Testanforderung bis zum verfügbaren Befund 10 Tage (Bereich 8-12 Tage), während es für Myriad myChoice® CDx 19,79 Tage (Bereich 14-28 Tage) dauerte.

Patient	Alter	Histotyp	Entnahmeart	Lokalisation	Tumoranteil
ID_01	61	HGSOC	OP	Tube	90
ID_02	46	HGSOC	PE	Peritoneum	50
ID_03	63	HGSOC	OP	Adnexe	80
ID_04	75	HGEOC	OP	Adnexe	80
ID_05	59	HGSOC	OP	Adnexe	60
ID_06	76	HGSOC	PE	Portio	90
ID_07	64	Mucinöses OC	OP	Adnexe	80
ID_08	62	HGEOC	OP	Adnexe	80
ID_09	78	peritoneales AC	OP	Dünndarm	10
ID_10	81	HGSOC	OP	Colon	35
ID_11	83	HGSOC	OP	Ovar	80
ID_12	64	HGSOC	OP	Uterus	70
ID_13	36	STIL	OP	Uterus	40
ID_14	64	HGSOC	OP	Adnexe	60
ID_15	60	HGSOC	PE	Omentum	40
ID_16	66	HGSOC	OP	Uterus	70
ID_17	74	HGSOC	OP	Adnexe	80
ID_18	46	HGSOC	PE	gr Netz	80
ID_19	70	HGEOC	OP	Adnexe	80

Tabelle 8: Studienpopulation

3.2. DNA-Extraktion und -Quantifizierung

Drei der 18 DNA-Bibliotheken (ID_02, ID_13, ID_14) lagen unter der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 20 ng/µl und wurden von der aktuellen Analyse ausgeschlossen. Die restlichen 15 DNA-Bibliothek wiesen eine Konzentration von 22,1 bis 41,6 ng/µl auf, wobei die mittlere Konzentration bei 29,9 ng/µl lag. Damit lagen alle Proben über der empfohlenen Konzentration von 20 ng/µl, die vom Hersteller vorgeschlagen wurden. Es wurde festgestellt, dass alle Bibliotheken von ausgezeichneter Qualität waren. Die Hauptgröße der DNA-Fragmente, veranschaulicht in **Tabelle 9**, lag zwischen 260 und 265 bp, wobei der Medianwert bei 262,7 bp lag.

Bei allen 15 Validierungsanalysen (78,9%) wurden die vom Hersteller empfohlenen und validierten Kriterien erfüllt (Proben max. 1 Jahr alt, DNA-Input > 50 ng, Tumorgehalt > 30%).

Patient	DNA Konzentration ng/µl	Ergebnis QIAxel Median Size bp	Tumoranteil %
ID_01	22,1	262	90
ID_02	6,8	269	50
ID_03	29,6	265	80
ID_04	25,4	265	80
ID_05	41,6	262	60
ID_06	20,9	265	90
ID_07	27,9	263	80
ID_08	23	260	80
ID_10	40,8	265	35
ID_11	31,4	265	80
ID_12	40,4	262	70
ID_13	13,9	266	40
ID_14	13,6	266	60
ID_15	38,1	264	40
ID_16	24,3	260	70
ID_17	25,3	261	80
ID_18	28,9	262	80
ID_19	28,1	260	80

Tabelle 9: DNA-Konzentration der Bibliotheken und Fragmentgrößen

3.3. Sequenzierung

Die Bibliotheken wurde mit dem AmoyDx® HRD Focus Panel analysiert, das 24.000 SNV's untersucht, um das HRD-Scoring durchzuführen. Für jede Probe wurden 100 ng DNA verwendet. Die Sequenzierung erfolgte auf einem NextSeq®550Dx-Gerät von Illumina. Der HRD-Score (GScore) wurde berechnet, indem das Telomer-Allel-Ungleichgewicht (TAI), Verlust der Heterozygotie (LOH) und Large-Scale-Transition (LST, größere chromosomale Strukturveränderungen) mit Hilfe der ANDAS-Software (Amoy Diagnostics) summiert wurden. Die HRD-Positivität wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers definiert, indem ein GScore von ≥ 50 festgelegt

wurde. Die Sequenzierung am NextSeq®550Dx wurde in 2 Läufen erfolgreich durchgeführt (siehe **Abbildung 18**).

Datum Run	GSS Score PC	BRCA1 5251C>T % AF	BRCA2 4777G>T % AF	Q30 %	Coverage % PC	Uniformity (BRCA) % PC	Mean Effective Depth (BRCA) PC
	SOLL: positiv	SOLL: ~ 65%	SOLL: ~20%	SOLL: ≥ 75%	SOLL: ≥ 98%	SOLL: ≥ 95%	SOLL: ≥ 400x
22.11.2022	100	62,82	18,88	95,82	99,91	97,24	4573
18.01.2023	100	68,86	21,10	95,71	95,71	98,82	6136

Datum Run	Uniformity (SNPs) % PC	Mean Effective Depth (SNPs) PC	Beurteilung der Q-Kriterien + Kürzel
	SOLL: ≥90%	SOLL: ≥200x	Grün: passt Rot: passt nicht
22.11.2022	91,12	332	ER
18.01.2023	94,59	395	ER

Abbildung 18: Beurteilung der Qualitätskriterien der zwei durchgeführten NGS-Läufe

3.4. Vergleich von HRD-Status-Bewertung: AmoyDx® HRD Focus Panel vs. Myriad myChoice® CDx Assay

Myriad stufte die Probe als HRD positiv ein, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Pathogene oder wahrscheinlich pathogene Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 und/oder
- positiver genomischer Instabilitäts-Score GIS ≥42

AmoyDX klassifizierte ebenfalls die Probe als HRD positiv ein, wenn

- Pathogene oder wahrscheinlich pathogene Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 und/oder

- positiver genomischer Instabilitäts-Score GSS ≥ 50 festgestellt wurde.

5 Proben waren übereinstimmend negativ, 8 Proben waren übereinstimmend positiv, 2 Proben waren diskrepant (siehe **Tabelle 10**).

Patient	Alter	Myriad Bewertung	GI-Score Myriad	AmoyDx Bewertung	GS-Score AmoyDx	Tumoranteil %
ID_01	61	negativ	17	negativ	7,2	90
ID_03	63	positiv	63	positiv	98,7	80
ID_04	75	positiv	58	positiv	92,7	80
ID_05	59	positiv	62	positiv	92,7	60
ID_06	76	negativ	17	positiv	53,2	90
ID_07	64	negativ	4	negativ	2,5	80
ID_08	62	negativ	6	negativ	1,1	80
ID_10	81	negativ	39	positiv	86	35
ID_11	83	negativ	16	negativ	11,5	80
ID_12	64	positiv	64	positiv	97,6	70
ID_15	60	negativ	39	negativ	34,6	40
ID_16	66	positiv	53	positiv	95,1	70
ID_17	74	positiv	65	positiv	99,1	80
ID_18	46	positiv	58	positiv	99,5	80
ID_19	70	positiv	71	positiv	95	80

Tabelle 10: Gegenüberstellung Ergebnisse Myriad GI Score und Amoy DX GS Score

Beide diskrepanten Proben zeigten bei AmoyDx ein positives und bei Myriad ein negatives Ergebnis. Eine dieser beiden Proben lag bei Myriad sowohl beim Tumorgehalt (35%) als auch beim HRD-Score (39) im Grenzbereich. Die Probe wurde zur Verifizierung an die Pathologie der Medizinischen Universität Graz gesendet. Die Pathologie Graz konnte bei dieser Probe mittels OncoPrint™ Panel (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) ebenfalls einen positiven HRD-Score ermitteln. Diese Probe wurde daher in der vorliegenden Validierung als richtig positiv bewertet.

Die klinisch-pathologischen Merkmale der diskordanten Fälle werden in der **Tabelle 11** dargestellt. Der Vergleich der HRD-Ergebnisse: GSS AmoyDx (Cut-off 50) und GSI Myriad (Cut-off 42) ist in **Abbildung 19** dargestellt.

Patient	Myriad Bewertung	GI-Score Myriad	AmoyDx Bewertung	GS-Score AmoyDx	Tumoranteil %	Alter	Histotyp	UM	TAT Myriad Angabe in Tagen
ID_06	negativ	17	positiv	53,2	90	76	HGSOC	PE Portio	20
ID_10	negativ	39	positiv	86	35	81	HGSOC	OP Colon	23

Tabelle 11: Darstellung der diskordanten Fälle

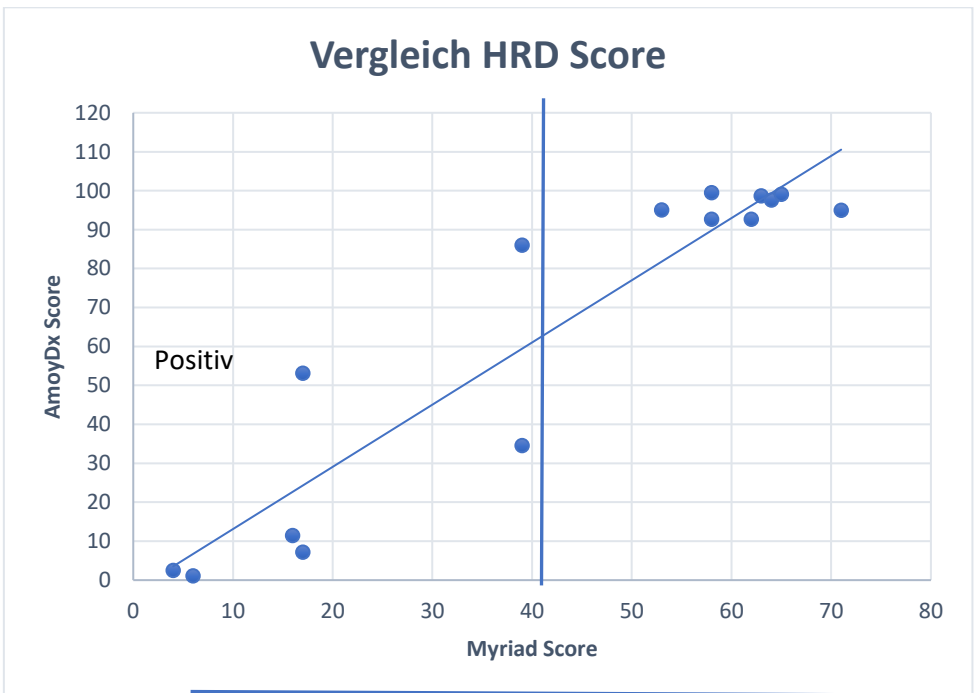


Abbildung 19: Vergleich der HRD-Ergebnisse: GSS AmoyDx (Cut-off 50) und GSI Myriad (Cut-off 42).

Weiters wurde der positive prädiktiver Wert (PPA), der negative prädikative Wert (NPA) sowie der Übereinstimmungswert overall percent agreement (OPA) anhand folgender Formel berechnet:

	Test Positiv	Test Negativ	Testergebnisse gesamt	Berechnung	
Krank	a (richtig positiv)	b (falsch negativ)	a + b (alle Kranken)	Sensitivität = a / (a + b)	
Gesund	c (falsch positiv)	d (richtig negativ)	c + d (alle Gesunden)	Spezifität = d / (c + d)	
Personen gesamt	a + c (alle im Test positiv)	b + d (alle im Test negativ)			
Berechnung	Positiver Prädiktiver Wert = a / (a + c)	Negativer Prädiktiver Wert = d / (b + d)		Overall percent agreement) (a+d)/(a+b+c+d)	

Übereinstimmung OPA (overall percent agreement) zwischen AmoyDx® HRD Focus Panel und Myriad myChoice® CDx Assay:

Übereinstimmung zwischen den Tests (OPA, overall percent agreement)

				Sensi/Spezi %
	8	0		100
	2	5		71,43
PPA/NPA %	80,0	100		
OPA				86,67

In Bezug auf den HRD-Status betrug die prozentuelle Übereinstimmung (OPA) zwischen AmoyDx® HRD Focus Panel und Myriad myChoice® CDx Assay **86,67%**, der positive prädiktive Wert (PPA) **80%** und der negative prädiktive Wert (NPA) **100%**.

Der lineare Zusammenhang (Pearson Korrelationskoeffizient) zwischen Myriad Score und AmoyDx Score beträgt **0,93**. (siehe **Abbildung 20**)

Correlation Tabular results		A X vs. Column A
1	Pearson r	
2	r	0.9308
3	95% confidence interval	0.8001 to 0.9772
4	R squared	0.8665
5		
6	P value	
7	P (two-tailed)	<0.0001
8	P value summary	****
9	Significant? (alpha = 0.05)	Yes
10		
11	Number of XY Pairs	15
12		
13		

Abbildung 20: Pearson Korrelationskoeffizient

Vollständige Konkordanz wurde in 15 (100 %) der Proben erreicht, darunter 11 (73,3%) Tumore ohne BRCA-Mutation und 4 (26,7%) Tumore mit BRCA-pathogener Mutation. Die Ergebnisse der BRCA- Mutationen sind in **Tabelle 12** dargestellt.

Patient	BRCA Mutation Myriad	BRCA Mutation AmoyDX
ID_01	wt	wt
ID_03	BRCA 1 c.5017_5019del:p.(H1673del)	BRCA 1 c.5017_5019del:p.(H1673del)
ID_04	wt	wt
ID_05	wt	wt
ID_06	wt	wt
ID_07	wt	wt
ID_08	wt	wt
ID_10	wt	wt
ID_11	wt	wt
ID_12	BRCA 1 c.3018_3021del:p.(H1006Qfs*17)	BRCA 1c.3018_3021del:p.(H1006Qfs*17)
ID_15	wt	wt
ID_16	wt	wt
ID_17	BRCA 1 c.4183C>T:p.(Gln1395*)	BRCA1c.4183C>T:p.(Q1395*):p.(Gln1395*)
ID_18	BRCA 1 c.5266dupC:p.(Gln1756Profs*74)	BRCA1c.5266dupC:p.(Gln1756Profs*74)
ID_19	wt	wt

Tabelle 12: Übereinstimmung der BRCA 1/2 Mutationsanalysen zwischen Myriad und AmoyDX

4. Diskussion

Die Einführung von Poly-ADP-Ribose- Polymerase (PARP) Inhibitoren hat das Management von hochgradig serösem Ovarialkarzinom (HGSC) sowohl in der Rezidiv- als auch in der Erstlinienbehandlung revolutioniert. Eine wichtige Entwicklung war die Beurteilung des Status der homologe Rekombinationsdefizienz (HRD) als klinisch relevanter Biomarker für therapeutische Entscheidungen. HRD bezieht sich auf einen Funktionsmangel in der homologen Rekombinations-DNA-Reparatur, der durch Mutationen in BRCA1/2 oder anderen Mechanismen verursacht werden kann. Sie ist ein häufiges Merkmal bei hochgradig serösem Ovarialkarzinom (HGSOC) und weist auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber PARP-Inhibitoren hin. HRD verursacht dauerhafte Veränderungen im Genom, die als "genomische Narben" bezeichnet werden und bestimmte, messbare Muster aufweisen. Die Verfügbarkeit zuverlässiger Methoden zur Bestimmung des HRD-Status ist entscheidend, um den klinischen Nutzen von PARP-Inhibitoren optimal zu nutzen. Klinische Tests wie der Myriad myChoice® CDx (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA) und der FoundationOne® CD Assay (Foundation Medicine, Cambridge, MA, USA) zielen darauf ab, das Vorhandensein von HRD basierend auf genomischen Merkmalen vorherzusagen.

Der Myriad myChoice® CDx Assay, wird zentral durch die Firma Myriad durchgeführt und ist kostenintensiv, weshalb eine kostengünstigere und zeitsparende Alternative dringend benötigt wird. Die wissenschaftliche Gemeinschaft äußert außerdem Bedenken darüber, dass die erzeugten wissenschaftlichen Daten und die medizinischen Erkenntnisse kommerziell verwertet werden und nicht der wissenschaftlichen Allgemeinheit zur Verfügung gestellt werden. Dies hat Besorgnis hinsichtlich der möglichen Bildung einer monopolartigen Position ausgelöst.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Leistungsmerkmale des kommerziell verfügbaren molekularen Assays, AmoyDx® HRD Focus Panel (AmoyDx, Xiamen, China), der das Potenzial hat, HRD-positive Tumoren durch genomische Instabilität bei Eierstockkrebs zu identifizieren, erhoben. Das Ziel war es, die Machbarkeit sowie Zuverlässigkeit dieses Assays im Vergleich zu Myriad myChoice® CDx zu

untersuchen und darüber hinaus die Ergebnisse der Konkordanzanalyse mit bereits durchgeführten Studien zu vergleichen.

Um einen effizienten und umfassenden internen Workflow für HRD-Tests zu etablieren, haben wir eine Kohorte von 15 Patienten mit epitheliale Ovarialkarzinom (EOC) mit dem CE-IVD AmoyDx® HRD Focus Panel analysiert.

In 78,9% Fälle konnte eine Analyse mittels AmoyDx® HRD Focus Panel durchgeführt werden. Misserfolge traten hauptsächlich aufgrund einer geringen extrahierten DNA-Ausbeute auf, insbesondere bei suboptimaler DNA-Qualität, die durch die präanalytischen Bedingungen (wie zum Beispiel Formalinbehandlung) sowie nekrotisches Gewebe verursacht wurden. Es ist bemerkenswert, dass das AmoyDx® HRD Focus Panel eine durchschnittliche Durchlaufzeit (TAT) von 10 Tagen von der Testanforderung bis zum verfügbaren Befund aufwies, während die TAT von Myriad myChoice® CDx fast doppelt so lange dauerte (19,79 Tage), was auf den langen Transportweg zurückzuführen ist.

Die Erfolgsrate wie auch die TAT müssen sorgfältig berücksichtigt werden, um sicherzustellen, dass der Test effektiv und zeitnah die relevanten Informationen liefert, um die bestmögliche Behandlungsentscheidung für jede einzelne Patientin zu treffen. In Anbetracht dieser klinischen Notwendigkeit ist die Implementierung eines vollständigen internen Workflows für HRD-Tests von entscheidender Bedeutung, um eine schnelle und präzise Bestimmung des HRD-Status bei HGSC-Patienten zu gewährleisten. Ein Vorteil bei der Durchführung von internen Tests liegt in der Möglichkeit, die Qualität und Menge der Probe präzise zu kontrollieren und gegebenenfalls eine besser geeignete Probe auszuwählen.

Indem auf das AmoyDx® HRD Focus Panel zurückgegriffen wurde, konnten die Analyse in unserem Labor problemlos durchgeführt werden. Die benutzerfreundliche Natur des Panels ermöglichte es den Tests reibungslos durchzuführen. Ein weiterer wesentlicher Vorteil dieses Panels ist die erhebliche Kostenersparnis, die es bietet. Im Vergleich zum Myriad myChoice® CDx -Test, der bisher als Goldstandard galt, konnte die Kosten reduziert werden, ohne dabei Kompromisse bei der Qualität oder der Aussagekraft der Ergebnisse einzugehen. Diese Kosteneinsparungen sind von unschätzbarem Wert, da sie es ermöglichen,

HRD-Tests für eine größere Anzahl von Patienten zugänglich zu machen und damit einen breiteren Einsatz in der klinischen Praxis zu verschaffen.

Alle 15 Proben wurden einer Bewertung mittels des Goldstandards Myriad myChoice® CDx unterzogen und erzielten eine Übereinstimmung (Overall Percent Agreement, OPA) von **86,67%**. Der positive prädiktive Wert (PPA) lag bei **80%** und der negative prädiktive Wert (NPA) bei **100%**. Der lineare Zusammenhang (Pearson Korrelationskoeffizient) zwischen Myriad Score und AmoyDx Score betrug **0,93**.

Die in jüngster Zeit durchgeführten Studien (38, 51, 52), die die Leistungsfähigkeit des AmoyDx HRD Focus Panels unter Beweis stellten und hohe Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen von AmoyDx® HRD Focus Panel und Myriad myChoice® CDx zeigten, erzielten ähnliche Ergebnisse.

In den Studien von Weichert et al. wurde die Leistungsfähigkeit von bereits kommerziell verfügbaren und in Entwicklung befindlichen Assays verglichen, die auf unterschiedlichen Technologien wie SNP-Array, Panelsequenzierung oder Low-Pass Whole-Genome Sequencing (WGS) basieren. Die genomische Instabilität wurde mithilfe verschiedener Assays gemessen, darunter CytoSNP™ (Illumina), AmoyDX® HRD Focus Panel (AmoyDx), TSO 500+™ (Illumina), OncoPrint™ (Thermo Fisher), OncoScan™ (Thermo Fisher), Agilent NOGGO GIS v1® (Agilent Technologies, Inc.), QIASeq® HRD-Panel (Qiagen) und Tiefpassesequenzierung des gesamten Genoms. Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit wurden die Assays in den meisten Fällen zweimal unabhängig voneinander in zwei Labors durchgeführt. Die GIS-Scores sowie der BRCA-Mutationsstatus wurden miteinander sowie mit den Ergebnissen des Myriad-Assays verglichen. Die Übereinstimmung (Overall Performance Agreement OPA) der Bestimmung des HRD- Status zwischen AmoyDx® HRD Focus Panel - und Myriad myChoice® CDx lag bei 81,6%, die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) bei 88,0 %, negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) bei 75,0 % Die Korrelation mit 0,87 war ebenfalls sehr hoch (52).

Fumagalli et al. demonstrierten in ihrer Untersuchung von 74 Tumoren eine allgemeine Übereinstimmung (OPA) von 87,8 %, die PPA von 83,3 % und die NPA von 100 %. (38).

In einer kleinen Studie von Maglicane et al. konnte sogar eine 100% allgemeine Übereinstimmung (OPA) gezeigt werden. (51)

Bemerkenswert ist ebenfalls, dass sowohl das AmoyDx® HRD Focus Panel - als auch der Myriad myChoice® CDx Assay bei allen Patienten mit BRCA1/2-Veränderungen dieselben Varianten identifiziert haben.

Die Einschränkung des HRD-Tests liegt in der Definition und Anwendung des zusammengesetzten HRD-Scores, der aus der nicht gewichteten Summe von drei einzelnen Faktoren (LOH, TAI, LST) besteht. Die Festlegung eines Cut-off-Werts für diesen Score, der einen Tumor als HR-defizient kennzeichnet, variiert je nach Testsystem. Zum Beispiel hat der myChoice® CDx von Myriad derzeit einen Cut-off-Wert von ≥ 42 , basierend darauf, dass 95% der BRCA-defizienten Tumore einen HRD-positiven Wert (also ≥ 42) erreichen. Der Cut-off-Wert des AmoyDx Panels liegt bei 50. Diese Cut-off-Werte können jedoch in anderen Tests und Entitäten variieren, und es gibt eine Grauzone, in der die genaue HRD-Status-Bestimmung schwierig sein kann (43).

Kekeeva et al. haben den Einfluss der Tumorreinheit auf die Bestimmung von GSS-Scores untersucht und festgestellt, dass bei einer Tumorreinheit von 30 % eine signifikante Abnahme der hohen GSS-Werte im Vergleich zu Gruppen mit 40 %, 50 %, 60 % und 100 % Tumorgehalt auftritt, und schlagen Tumorreinheit von 40% oder mehr als kritischer Faktor für die GSS-Messung vor (53) .

Diese Annahme bestätigt einer der beiden diskordanten Fälle der Arbeit (ID_10). Dieser wies einen Tumoranteil von 35% auf. Der HRD-Status dieses Falles wurde seitens Myriad als negativ und mittels AmoyDx® HRD Focus Panel und Oncomine™ Panel (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) als positiv bewertet.

Eine Einschränkung besteht auch im Fehlen von Informationen über die HRR-bezogenen Gene jenseits von BRCA1/2, was möglicherweise wichtige Aspekte der HRD-Bewertung unberücksichtigt lässt.

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt, den es zu berücksichtigen gilt, ist der Vorhersagewert von genomischen Narben-HRD-Tests. Aktuelle klinische HRD-Assays können zwar den HRD-Status eines Tumors bestimmen, sind jedoch noch

keine perfekten Vorhersagemodelle für die tatsächliche Reaktion auf PARP-Inhibitoren, da sie Ereignisse in der Tumorentwicklung, wie die mögliche Wiederherstellung der HRR-Aktivität als Reaktion auf selektiven therapeutischen Druck, nicht umfassend erfassen können.

Die laufende Forschung zielt darauf ab, die Erkennung von HRD zu verfeinern und Patienten auszuwählen, die den größten Nutzen aus PARPi und ähnlichen Therapien ziehen können. Gleichzeitig soll die Toxizität bei Patienten vermieden werden, die voraussichtlich nicht auf diese Behandlung ansprechen werden. Die Weiterentwicklung der HRD-Evaluierung und die Identifizierung präziser Biomarker sind entscheidend, um die optimale klinische Anwendung von HRD-Tests voranzutreiben und die personalisierte Behandlung von Eierstockkrebs zu verbessern.

Insgesamt hat die Einführung des AmoyDx® HRD Focus Panels in unserem Labor die Effizienz und den klinischen Nutzen unserer HRD-Tests erheblich gesteigert. Die Kombination aus einfacher Handhabung, kosteneffektiven Lösungen und einer beeindruckend schnellen TAT macht dieses Panel zu einer guten Wahl für die zuverlässige Bestimmung des HRD-Status bei HGSC-Patienten. Wir sind zuversichtlich, dass dieser interne Workflow dazu beitragen wird, die Behandlungsstrategien für unsere Patientinnen zu optimieren und ihnen eine bessere Chance auf eine erfolgreiche Therapie zu bieten.

5. Literatur

Literature Cited

1. SEER Incidence Data. Nationales Krebsinstitut. Programm für Überwachung, Epidemiologie und Endergebnisse. Fakten zur Krebsstatistik: Eierstockkrebs; 2023 [cited 2023 Aug 12]. Available from: URL: <https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer>.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3):209–49.
3. Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017; 41:3–14.
4. Mag. Dr.scient.med. Monika Hackl, Petra Ihle BA. *Krebserkrankungen in Österreich 2020*; 2020 [cited 2023 May 21]. Available from: URL: https://www.statistik.at/fileadmin/publications/Krebserkrankungen_2022.pdf.
5. Sueblinvong T, Ghebre R, Iizuka Y, Pambuccian SE, Isaksson Vogel R, Skubitz APN et al. Establishment, Characterization and Downstream Application of Primary Ovarian Cancer Cells Derived from Solid Tumors. *PLoS One* 2012; 7(11).
6. Agaimy A. *Pathologie: Das Lehrbuch*. 6., vollständig überarbeitete Auflage. München, Deutschland: Elsevier; 2019.
7. Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004; 164(5):1511–8.
8. Petru E, Fink D, Köchli OR, Loibl S, editors. *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. 5., vollst. überarb. u. akt. Auflage 2019. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019.
9. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Ann Oncol* 2013; 24 Suppl 10:x16-21.
10. Narod S. Can advanced-stage ovarian cancer be cured? *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13(4):255–61.
11. Mutch DG, Prat J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol Oncol* 2014; 133(3):401–4.
12. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2):69–90.
13. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 2008; 77:229–57.
14. 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; 31(12):1606–22.

15. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(15):1382–92.
16. Fuh K, Mullen M, Blachut B, Stover E, Konstantinopoulos P, Liu J et al. Homologous recombination deficiency real-time clinical assays, ready or not? *Gynecol Oncol* 2020; 159(3):877–86.
17. Vergote I, Denys H, Altintas S, Kerger J, Baurain J-F, Bours V et al. Homologous recombination repair deficiency (HRD) testing in newly diagnosed advanced-stage epithelial ovarian cancer: A Belgian expert opinion. *Facts Views Vis Obgyn* 2022; 14(2):111–20.
18. Wagener-Ryczek S, Merkelbach-Bruse S, Siemanowski J. Biomarkers for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. *J Pers Med* 2021; 11(7).
19. Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma. *Nature* 2011; 474(7353):609–15.
20. Rebbeck TR, Mitra N, Wan F, Sinilnikova OM, Healey S, McGuffog L et al. Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer. *JAMA* 2015; 313(13):1347–61.
21. Creeden JF, Nanavaty NS, Einloth KR, Gillman CE, Stanbery L, Hamouda DM et al. Homologous recombination proficiency in ovarian and breast cancer patients. *BMC Cancer* 2021; 21(1):1154.
22. Ngoi NYL, Tan DSP. The role of homologous recombination deficiency testing in ovarian cancer and its clinical implications: do we need it? *ESMO Open* 2021; 6(3):100144.
23. Moschetta M, George A, Kaye SB, Banerjee S. BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer. *Ann Oncol* 2016; 27(8):1449–55.
24. Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD. Homologous recombination deficiency: Exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer Discov* 2015; 5(11):1137–54.
25. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, Lee MK, Pennil CC, Rendi MH et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2014; 20(3):764–75.
26. Walsh CS. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. *Gynecol Oncol* 2015; 137(2):343–50.
27. Fong PC, Yap TA, Boss DS, Carden CP, Mergui-Roelvink M, Gourley C et al. Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol* 2010; 28(15):2512–9.

28. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol* 2011; 12(9):852–61.
29. Li S. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009; 361(17):1707; author reply 1707-8.
30. Coleman RL, Oza AM, Lorusso D, Aghajanian C, Oaknin A, Dean A et al. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390(10106):1949–61.
31. Oza AM, Tinker AV, Oaknin A, Shapira-Frommer R, McNeish IA, Swisher EM et al. Antitumor activity and safety of the PARP inhibitor rucaparib in patients with high-grade ovarian carcinoma and a germline or somatic BRCA1 or BRCA2 mutation: Integrated analysis of data from Study 10 and ARIEL2. *Gynecol Oncol* 2017; 147(2):267–75.
32. Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim B-G, Oaknin A, Friedlander M et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2018; 379(26):2495–505.
33. González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, DePont Christensen R, Graybill W, Mirza MR et al. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019; 381(25):2391–402.
34. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, González-Martín A, Berger R et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019; 381(25):2416–28.
35. Coleman RL, Fleming GF, Brady MF, Swisher EM, Steffensen KD, Friedlander M et al. Veliparib with First-Line Chemotherapy and as Maintenance Therapy in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019; 381(25):2403–15.
36. Heitz F, Ataseven B, Staniczok C, Denkert C, Rhiem K, Hahnen E et al. Implementing HRD Testing in Routine Clinical Practice on Patients with Primary High-Grade Advanced Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)* 2023; 15(3).
37. Vergote I, González-Martín A, Ray-Coquard I, Harter P, Colombo N, Pujol P et al. European experts consensus: BRCA/homologous recombination deficiency testing in first-line ovarian cancer. *Ann Oncol* 2022; 33(3):276–87.
38. Fumagalli C, Betella I, Ranghiero A, Guerini-Rocco E, Bonaldo G, Rappa A et al. In-house testing for homologous recombination repair deficiency (HRD) testing in ovarian carcinoma: a feasibility study comparing AmoyDx HRD Focus panel with Myriad myChoiceCDx assay. *Pathologica* 2022; 114(4):288–94.
39. Mangogna A, Munari G, Pepe F, Maffii E, Giampaolino P, Ricci G et al. Homologous Recombination Deficiency in Ovarian Cancer: from the Biological Rationale to Current Diagnostic Approaches. *J Pers Med* 2023; 13(2).
40. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A et al. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer.

New England Journal of Medicine 2016 Oct 7; 375(22):2154–64. Available from: URL: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1611310>.

41. Hoppe MM, Sundar R, Tan DSP, Jeyasekharan AD. Biomarkers for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2018; 110(7):704–13.

42. Foundation Medicine, Inc. FoundationOne®CDx Technical Information [cited 2023 Jul 30]. Available from: URL: https://assets.ctfassets.net/w98cd481qyp0/41rJj28gFwtxCwHQxopaEb/70c6c95b4edfe8c18c27c2e2461e5c28/FoundationOne_CDx_Label_Technical_Info.pdf.

43. Pfarr N, Merkelbach-Bruse S. Defizienz der homologen Rekombinationsreparatur als prädiktiver Marker : Grundlagen und Nachweis. *Pathologe* 2021; 42(4):391–8.

44. VERORDNUNG (EU) 2017/746 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 5. April 2017 über In-vitro-Diagnostika und zur Aufhebung der Richtlinie 98/79/EG und des Beschlusses 2010/227/EU der Kommission: In-vitro-Diagnostika-Verordnung: IVDR; 2017; 2017 [cited 2023 Jul 9]. Available from: URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0746>.

45. Lih C-J, Harrington RD, Sims DJ, Harper KN, Bouk CH, Datta V et al. Analytical Validation of the Next-Generation Sequencing Assay for a Nationwide Signal-Finding Clinical Trial: Molecular Analysis for Therapy Choice Clinical Trial. *J Mol Diagn* 2017; 19(2):313–27.

46. Myriad Genetic Laboratories I. MyChoice® CDx Technical Information [cited 2023 Jun 10]. Available from: URL: <https://myriad.com/genetic-tests/mychoicecdxtumor-test/>.

47. Pepe F, Guerini-Rocco E, Fassan M, Fusco N, Vacirca D, Ranghiero A et al. In-house homologous recombination deficiency testing in ovarian cancer: a multi-institutional Italian pilot study. *J Clin Pathol* 2023.

48. Ni J, Cheng X, Zhao Q, Dai Z, Xu X, Guo W et al. The efficacy and safety of niraparib for ovarian cancer: a single-center observational study from China. *J Ovarian Res* 2021; 14(1):68.

49. Amoy Diagnostics Co., Ltd. AmoyDx® HRD Focus Panel (Reversible Terminator Sequencing) Instruction for Use; Version: B1.1 [cited 2023 Jul 2]. Available from: URL: <http://www.amoydiagnostics.com/>.

50. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al. 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. *Genet Med* 2015; 17(5):405–24.

51. Magliacane G, Brunetto E, Calzavara S, Bergamini A, Pipitone GB, Marra G et al. Locally Performed HRD Testing for Ovarian Cancer? Yes, We Can! *Cancers (Basel)* 2022; 15(1).

52. Weichert W, Lukashchuk N, Yarunin A, Riva L, Easter A, Bannister H et al. 216 An evaluation of the performance of molecular assays to identify homologous recombination deficiency-positive tumours in ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* 2021; 31(Suppl 3):A366-A366.
53. Kekeeva T, Andreeva Y, Tanas A, Kalinkin A, Khokhlova S, Tikhomirova T et al. HRD Testing of Ovarian Cancer in Routine Practice: What Are We Dealing With? *Int J Mol Sci* 2023; 24(13).