
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Perspective evoluționiste în cancerul ovarian

Doctorand **Milan-Paul Kubelac**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Patriciu Achimaș-Cadariu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Evoluția clonală în cancerul ovarian	17
1.1. Introducere	17
1.2. Epidemiologia și istoria naturală a cancerului ovarian	19
1.3. Evoluția clonală în cancerul ovarian – heterogenitatea spațială	21
1.4. Evoluția clonală în cancerul ovarian – heterogenitatea temporală	23
1.5. Caracteristici clinice și principii terapeutice	25
2. Deficiența de recombinare omoloagă în cancerul ovarian	29
2.1. Impactul agenților pe bază de platină asupra ADN-ului	29
2.2. Mecanisme de reparare a ADN-ului	30
2.3. Alterarea căilor de reparare a ADN-ului în cancerul ovarian	31
2.4. Implicații clinice ale deficienței de recombinare omoloagă	31
3. Rolul prognostic al căii de semnalizare HIPPO conservate evoluționar	35
3.1. Calea fiziologică de semnalizare HIPPO	35
3.2. Alterații ale căii de semnalizare HIPPO în cancer	36
3.3. Alterații ale căii de semnalizare HIPPO în cancerul ovarian	37
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru	41
2. Studiul 1 - Caracteristici clinice asociate cu mutații ale genelor BRCA 1 și 2 în cancerul ovarian	43
2.1. Introducere	43
2.2. Ipoteza de lucru	44
2.3. Material și metodă	44
2.4. Rezultate	45
2.5. Discuții	50
2.6. Concluzii	51
3. Studiul 2 - Modificări ale markerilor de răspuns la deteriorarea ADN-ului asociate cu tratamentul în cancerul ovarian avansat	53
3.1. Introducere	53
3.2. Ipoteza de lucru	55
3.3. Material și metodă	55

3.4. Rezultate	59
3.5. Discuții	71
3.6. Concluzii	73
4. Studiul 3 - Analiza comprehensivă a expresiei genelor cheie din calea de semnalizare Hippo și impactul lor prognostic în cancerul ovarian	75
4.1. Introducere	75
4.2. Ipoteza de lucru	76
4.3. Material și metodă	77
4.4. Rezultate	79
4.5. Discuții	113
4.6. Concluzii	115
5. Concluzii generale	117
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	119
REFERINȚE	121

Cuvinte cheie: cancer ovarian, heterogenitate tumorală, deficiență de recombinare omoloagă, BRCA 1/2, chimiosensibilitate, prognostic

Introducere

Cancerul ovarian are cea mai mare rată de mortalitate din sfera cancerelor ginecologice și din punct de vedere epidemiologic reprezintă o problemă la nivel global cu peste 300.000 de cazuri noi anual. Simptomatologia nespecifică întârzie prezentarea timpurie a pacientelor în vederea unui diagnostic și tratament corect și complet, cele mai multe paciente fiind diagnosticate cu o boală diseminată.

Prin avansul tehnologiilor moleculare teoria evoluționistă descrisă inițial de Charles Darwin a prins contur și în oncologie unde celulele tumorale sunt considerate populații cu reproducere asexuată aflate într-o nișă a micromediului tumoral unde acestea evoluează și concurează pentru resurse limitate, supraviețuirea fiind asigurată pentru acele subclone celulare care prezintă cel mai bun profil de adaptabilitate. În prezenta lucrare ne-am propus să caracterizăm defectele de reparare a ADN-ului în cancerul ovarian și una din căile sale de semnalizare conservate evolutiv pentru a putea profila dintr-o perspectivă evoluționistă comportamentul biologic al acestuia în vederea stabilirii unor prognostice mult mai fidele și în vederea definirii unor secvențe terapeutice optimizate care să conducă în viitor la ameliorarea rezultatelor oncologice.

Stadiul actual al cunoașterii

„Stadiul actual al cunoașterii” aduce în discuție teoria evoluționistă conform căreia "Nimic din biologie nu are sens decât în lumina evoluției". În consecință, clonele tumorale sunt echivalentul cvasi-speciilor unicelulare, există o selecție secvențială printr-un proces evolutiv de sublinii celulare care sunt din ce în ce mai anormale, atât genetic, cât și biologic. Astfel este discutată heterogenitatea spațială și temporală a cancerului ovarian. În principiu, chimioterapia acționează preponderent asupra celulelor cu un indice de proliferare crescut, și este eficientă împotriva acelei proporții de celule tumorale aflate în diferite faze ale ciclului de diviziune. Cu toate acestea, nu toate celulele maligne sunt eradicate, iar mutațiile acumulate în aceste subpopulații celulare pot induce rezistența ulterioară la tratament. Până la jumătate din cancerele ovariene de grad înalt prezintă defecte în repararea leziunilor ADN induse de agenții chimioterapici care pot modifica sensibilitatea la chimioterapie precum și prognosticul ulterior. Astfel, reprezintă un subiect de interes coordonarea dintre proliferarea celulară și moartea celulară programată. Mecanismele care stau la baza acestei reglementări sunt complexe, iar calea Hippo descoperită în urmă cu aproape două decenii, prezintă funcții importante în proliferarea celulară și moartea celulelor în *Drosophila*, fiind una dintre cele mai bine conservate evoluționar căi de semnalizare la oameni.

Contribuția personală

Studiu 1. Caracteristici clinice asociate cu mutații ale genelor BRCA 1 și 2 în cancerul ovarian

Obiective. Printre mecanismele de reparare a leziunilor ADN, genele BRCA 1 și 2 joacă un rol important în repararea leziunilor dublu catenare prin calea de recombinare omoloagă care este frecvent utilizată în repararea leziunilor induse de compuși pe bază de platină. Ipoteza de lucru în studiul de față a fost descrierea caracteristicilor clinice ale sensibilității la platină asociate cu mutații în genele BRCA 1 și 2 în cancerul ovarian atât în PDS cât și în IDS.

Material și metodă. Optzeci și opt de paciente care au fost testate pentru prezența mutațiilor BRCA 1 și 2 între mai 2016 și august 2018 au fost incluse în studiu. Pacientele au avut cancer ovarian confirmat histologic, indiferent de stadiul bolii. Pentru detecția mutațiilor în genele BRCA 1 și 2 germline sau somatice ADN-ul a fost extras folosind un kit BRCA comercial disponibil.

Rezultate. Mai mult de 90% din cazuri au fost cancer ovarian seros de grad înalt, iar majoritatea pacientelor (63, 71.6%) au fost diagnosticate în stadiul FIGO avansat IIIC-IV. Un număr de 39 (44.3%) de paciente au avut o mutație BRCA1/2 germinală sau somatică patogenă. PDS a fost oferită la 51 (58%) paciente. Prezența mutației BRCA a fost asociată cu o frecvență mai mare a RPC după NACT (OR 5.03, $p=0.033$), o frecvență mai mare a unei prime sau a doua recidive sensibilă la platină (aparitia recidivei după minimum 6 luni de la ultima administrare a chimioterapiei pe bază de platină) (OR 3.29, $p=0.003$ și, respectiv, OR 3.06, $p=0.031$) și o frecvență mai mare a răspunsurilor complete sau parțiale după chimioterapie la prima recidivă (OR 3.86, $p=0.029$) pentru cazurile cu mutație BRCA în comparație cu cazurile fără mutație BRCA. În subgrupul cu boală avansată (FIGO IIIC- IV) care au avut NACT, prezența mutației BRCA a fost asociată cu o semnificativ mai lungă PFS1 (23 față de 17.4 luni, $p=0.049$), PFS2 (11.5 față de 7.7 luni, $p=0.019$) și OS (67.1 față de 37.9 luni, $p=0.036$) comparativ cu cazurile fără mutație BRCA.

Concluzii. Deși nu am putut detecta un avantaj general de supraviețuire în întreaga populație de studiu, pacientele cu boală în stadiu avansat și status BRCAwt tratate cu chimioterapie neoadjuvantă, au avut o PFS și OS mai lungă față de pacientele cu status BRCAwt, sugerând că NACT în această populație de paciente ar avea un impact mai mic în selectarea subclonelor rezistente la platină fiind astfel necesară cunoașterea inițială a statusului BRCA la toate pacientele în vederea optimizării tratamentului primar, cu toate acestea, studii prospective mai mari sunt necesare pentru dezvoltarea ulterioară a acestui subiect.

Studiu 2. Modificări ale markerilor de răspuns la deteriorarea ADN-ului asociate cu tratamentul în cancerul ovarian avansat

Obiective. Având în vedere interacțiunea complexă dintre căile de reparare, o evaluare comprehensivă a efectorilor de reparare a ADN-ului poate oferi o perspectivă valoroasă asupra competenței de reparare a ADN-ului și prognosticului asociată tratamentul cu platină în linia 1. Ipoteza de lucru a fost evaluarea expresiei relative a efectorilor cheie propuși pentru repararea competentă a ADN-ului (HR: RAD51, FANCD2, ATM și BER: PAR, PARP-1), precum și repararea predispusă la erori (NHEJ): 53BP1).

Material și metodă. O cohortă de 147 de paciente cu cancer ovarian epitelial confirmat histologic, tratate între 2002 și 2014, au fost incluse în studiu. Am selectat paciente care au avut NACT și pentru care țesut tumoral secvențial a fost disponibil pre-, postchimoterapie și / sau la recidivă. Colorațiile IHC pentru toți markerii DDR au fost efectuate pe microarray-uri tisulare.

Rezultate. Toate pacientele aveau boală intraperitoneală avansată, iar 14,3% aveau boală în stadiul IV la diagnostic. Înainte de NACT, un număr semnificativ de cazuri nu aveau expresie a markerilor DDR: 60%, 60%, 24%, 21% și 14,8% erau PAR, FANCD2, RAD51, ATM sau 53BP1- negative. În urma chimioterapiei neoadjuvante pe bază de platină, a existat o creștere a proporției tumorilor cu markeri negativi, care a fost semnificativă statistic pentru PAR și RAD51 ($p < 0.01$). La recidivă, a existat o tendință ca ratele tumorilor marker negative să revină la nivelurile inițiale, cu excepția notabilă a 53BP1, pentru care proporția tumorilor 53BP1-negative a crescut de la 15% inițial la 27% la recidivă, cu o posibilă relevanță pentru rata de răspuns la PARPi la recidivă. Cazurile cu HR competentă (RAD51+), dar cu NHEJ predispusă la erori (53BP1-) la diagnostic au demonstrat o PFS și OS semnificativ mai scăzută în analiza multivariată (53BP1-/RAD51+, RH 3.13, $p = 0.009$ și RH 2.78, $p = 0.024$). În mod similar, pacientele cu dublă expresie a biomarkerilor pentru HR post-NACT (FANCD2+/RAD51+, RH 1.89, $p = 0.05$ și RH 2.38, $p = 0.02$) sau expresie duală a biomarkerilor BER și HR (PARP-1+/RAD51+, RH 1.79, $p = 0.038$ și RH 2.04, $p = 0.034$) au avut o PFS și OS detrimentală chiar și după ajustare pentru rezultatul IDS.

Concluzii. Am demonstrat că CO demonstrează frecvent pierderea unor efectori cheie de reparare a ADN-ului la diagnostic – cu excepția notabilă a PARP-1, ținta directă pentru PARPi. De asemenea, în mod liniștitor, NACT nu a crescut expresia markerilor de reparație eficientă a DSB și SSB, oferind dovezi indirecte că chimioterapia pe bază de platină în linia 1 nu a dus la selecția semnificativă a unor clone competente în repararea ADN-ului. Am demonstrat că RAD51+/FANCD2+ sau RAD51+/PARP1+ au fost factori prognostici pentru PFS și OS detrimentale în analiza multivariată. Studii suplimentare ar trebui să investigheze dacă evaluarea comprehensivă atât a competenței de reparare a ADN-ului, cât și a markerilor candidați pentru rezistența la PARPi precum pierderea PARP1 sau 53BP1, poate prezice capacitatea de răspuns diferențial la terapie.

Studiu 3. Analiza comprehensivă a expresiei genelor cheie din calea de semnalizare Hippo și impactul lor prognostic în cancerul ovarian

Obiective. Calea de semnalizare Hippo este o cascadă de protein-kinaze conservată evolutiv, care reglează dimensiunea organelor în cursul dezvoltării de la artropode la oameni. Mai multe dovezi au confirmat implicarea acestei căi în progresia cancerului și metastazare. În studiul actual am investigat rolul prognostic al nivelurilor de expresie ARNm al genelor implicate în calea de semnalizare Hippo la paciente cu CO.

Material și metodă. Am efectuat analiza profilului expresiei genelor pe probe de CO folosind baza de date GEPIA și UALCAN. KM plotter analizează genele individuale împreună cu rezultatele clinice, printre care PFS și OS. Un număr de 29 de paciente cu CO confirmat histologic tratate la Institutul Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca, România în perioada 2018-2020 au fost incluse în acest studiu pentru cohorta de validare.

Rezultate. A fost observat un nivel statistic semnificativ crescut pentru TP53 și un nivel redus de expresie pentru LATS1, LATS2, MST1, TAZ și TEF. Am observat o rată de mutație mai mare pentru TP53 (66%), STK3 (11%), YAP1 (10%), și o rată de mutație mai puțin frecventă pentru LATS1, LATS2, MST1, TAZ și TEF. Nivelele de expresie LATS1 și TAZ au scăzut odată cu stadiul și nu am observat diferențe semnificative în analiza de subgrup pentru gradul tumorii și statusul mutațional TP53. Cu excepția MST1, nivelurile de expresie pentru LATS1, LATS2, TP53, TAZ și TEF au avut un impact semnificativ ($p < 0.05$) asupra PFS. Expresia ridicată a MST1, LATS1 și TP53 a fost asociată cu un prognostic mai bun, în timp ce expresia scăzută a LATS2, TAZ și TEF a fost asociată cu un prognostic mai bun în CO. Rețeaua de interacțiune miARN-ARNm a evidențiat o corelație între genele implicate în semnalizarea Hippo, descoperind complexitatea ridicată a mecanismelor biologice, fiecare genă fiind vizată de un număr important de miARN. Nucleul rețelei este TP53, interconectat cu unul dintre cele mai puternice miARN supresoare tumorale, și anume miR-34a-5p (cunoscut în literatura de specialitate ca fiind legat de prognosticul CO), împreună cu miR-25-3p, let-7c-5p, miR-15a-5p și miR-125a-5p. Rezultate qRT-PCR în cohorta de validare confirmă profilurile anterioare de expresie genică și miARN din baza de date GEPIA.

Concluzii. Prin utilizarea bazelor de date online, am accesat nivelurile de expresie și am determinat rolurile prognostice ale genelor cheie implicate în semnalizare Hippo care au fost validate pe o cohortă suplimentară de paciente. Aceste rezultate indică faptul că genele cheie de semnalizare Hippo și miARN directe (miR-25-3p și miR-181c-5p) au o valoare prognostică importantă în OC. Este necesară o mai bună înțelegere a heterogenității și complexității OC pentru a dezvolta instrumente pentru noi strategii terapeutice și pentru a evalua cu precizie prognosticul.

Concluzii generale

1. Pacientele cu boală în stadiu avansat și status BRCA mutant tratate prin chimioterapie neoadjuvantă urmată de intervenție chirurgicală de debulking au avut o o supraviețuire fără progresia bolii și o supraviețuire globală superioară față de pacientele cu status BRCA de tip wildtype.
2. Cohorta de paciente cu status BRCA mutant și-a păstrat fenotipul sensibil la platină și la a doua recidivă, fiind de aproximativ 5 ori mai puțin susceptibile să-și schimbe fenotipul de la platinum sensibil la platinum rezistent. Astfel, chimioterapia neoadjuvantă în această populație de paciente ar avea un impact minim în selectarea subclonelor rezistente la platină fiind astfel imperios necesară cunoașterea inițială a statusului BRCA la toate pacientele în vederea optimizării tratamentului primar.
3. Prezența mutațiilor BRCA a fost asociată cu o frecvență semnificativ mai mare a răspunsului patologic complet după chimioterapia neoadjuvantă în comparație pacientele fără mutație BRCA, susținând astfel rolul secvenței neoadjuvante în această populație, minimizând astfel morbiditatea operatorie. De asemenea, răspunsul patologic complet poate reprezenta un surogat pentru sensibilitatea la platină fiind asociat cu o supraviețuire fără progresia bolii superioară în comparație cu cazurile în care nu s-a obținut un răspuns patologic complet.
3. Cancerul ovarian de tip seros demonstrează frecvent pierderea unor efectori cheie de reparare a ADN-ului la diagnostic, cu excepția notabilă a PARP-1, ținta directă pentru PARPi. Chimioterapia neoadjuvantă nu a crescut expresia markerilor de reparare eficientă a leziunilor ADN-ului, oferind dovezi indirecte că chimioterapia pe bază de platină în prima linie nu a dus la selecția semnificativă a unor clone competente în repararea ADN-ului.
4. Pierderea expresiei pentru PAR și expresia 53BP1 s-au asociat cu o supraviețuire fără progresie îmbunătățită sugerând că deficitul căii BER sau utilizarea căii NHEJ ar putea submina repararea eficientă a leziunilor induse de agenții pe bază de platină la nivelul ADN-ului. Evaluare combinată a biomarkerilor pentru repararea eficientă a ADN-ului după NACT (RAD51+/FANCD2+ sau RAD51+/PARP1+) a fost prognostică pentru supraviețuirea fără progresie și supraviețuirea globală în analiza multivariată.
5. Prezența HRD a fost indicativă pentru creșterea răspunsului imun intratumoral prin abundența unei încărcături neoantigenice.
6. Calea de semnalizare Hippo oferă interacțiuni multiple cu gene codante și non-codante, care sunt reglementate de o varietate de mecanisme. Genele cheie din calea de semnalizare Hippo și miRNA-urile lor directe (miR-25-3p și miR-181c-5p) au o valoare prognostică importantă în cancerul ovarian.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Având în vedere aspectele teoretice descrise în această teză propunem pentru o viitoare validare într-un studiu extins o secvență terapeutică preponderentă pe chimioterapia neoadjuvantă în cazurile avansate care prezintă mutații în calea HRR, fiind imperios necesară determinarea cu celeritate a statusului BRCA și a celorlalți mediatori HRR ca și metodă de testare reflexă după stabilirea diagnosticului histopatologic. Aceste cazuri prezintă un fenotip cu sensibilitate crescută la chimioterapia convențională manifest prin o supraviețuire ameliorată, păstrarea sensibilității la platină după multiple serii iterative.

Această teză a fost printre primele studii de cercetare care a descris la nivel internațional evoluția sub chimioterapie a multipli efectori implicați în DDR. Am demonstrat că la diagnostic o proporție semnificativă de cazuri prezintă pierderea unor efectori cheie ai DDR și pe lotul evaluat nu au existat semnale de îngrijorare cu privire la dezvoltarea rezistenței la platină prin chimioterapie neoadjuvantă. Utilitatea acestor markeri are și valoare prognostică, iar din punct de vedere predictiv se conturează ca biomarkeri robuști pentru sensibilitatea la platină și PARPi. De asemenea, evaluarea infiltratului tumoral limfocitar a fost crescută în tumorile care au prezentat HRD, prin frecvența crescută a leziunilor ADN care generează neoantigene responsabile de activarea imună, fiind printre primele studii care raportează această legătură și în cancerul ovarian.

Există o serie de alterații ale unor căi de semnalizare conservate evolutiv precum calea Hippo responsabilă de caracteristici esențiale celulelor tumorale, caracterizând o parte din mediatorii implicați în această rețea, fiind puține studii care au descris acest aspect în literatura de specialitate în cancerul ovarian.

În concluzie, contribuțiile originale ale acestei teze generate de o perspectivă evoluționistă pot sta la baza definirii unor noi algoritmi terapeutici care pot ameliora supraviețuirea pacienților cu cancer ovarian, dincolo de valoarea predictivă și prognostică a acestor biomarkeri.

PhD THESIS SUMMARY

Evolutionary perspectives in ovarian cancer

PhD student **Milan-Paul Kubelac**

PhD supervisor **Prof. Dr. Patriciu Achimaş-Cadariu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Clonal evolution in ovarian cancer	17
1.1. Introduction	17
1.2. Epidemiology and natural history of ovarian cancer	19
1.3. Clonal evolution in ovarian cancer – spatial heterogeneity	21
1.4. Clonal evolution in ovarian cancer – temporal heterogeneity	23
1.5. Clinical characteristics and therapeutic principles	25
2. Homologous repair deficiency in ovarian cancer	29
2.1. The DNA impact of platinum agents	29
2.2. DNA repair mechanisms	30
2.3. Alterations in DNA repair pathways in ovarian cancer	31
2.4. Clinical implications of homologous repair deficiency	31
3. The prognostic role of the evolutionary preserved Hippo pathway	35
3.1. The physiological Hippo pathway	35
3.2. The pathological Hippo pathway in cancer	36
3.3. The pathological Hippo pathway in ovarian cancer	37
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Aims	41
2. Study 1 – Clinical characteristics associated with BRCA 1 and 2 mutations in ovarian cancer	43
2.1. Introduction	43
2.2. Aims	44
2.3. Material and methods	44
2.4. Results	45
2.5. Discussion	50
2.6. Conclusions	51
3. Study 2 - Changes in DNA damage response markers with treatment in advanced ovarian cancer	53
3.1. Introduction	53
3.2. Aims	55
3.3. Material and methods	55
3.4. Results	59

3.5. Discussion	71
3.6. Conclusions	73
4. Study 3 - Comprehensive analysis of the expression of key genes related to Hippo signaling and their prognosis impact in ovarian cancer	75
4.1. Introduction	75
4.2. Aims	76
4.3. Material and methods	77
4.4. Results	79
4.5. Discussion	113
4.6. Conclusions	115
5. General conclusions	117
6. Originality and innovative contributions of the thesis	119
REFERENCES	121

Key words: ovarian cancer, tumor heterogeneity, homologous repair deficiency, BRCA 1/2, chemosensitivity, prognosis

Introduction

Ovarian cancer has the highest mortality rate in the field of gynecological cancers and epidemiologically it is a global problem with over 300,000 new cases annually. Nonspecific symptomatology delays the early presentation of patients for a correct and complete diagnosis and treatment, with most patients being diagnosed with a disseminated disease.

Through the advance of molecular technologies, the evolutionary theory originally described by Charles Darwin has also taken shape in oncology where tumor cells are considered populations with asexual reproduction in a niche of the tumor microenvironment where they evolve and compete for limited resources, survival being ensured for those cellular subclones that have the best adaptability profile. In this paper we have proposed to characterize the defects of DNA repair in ovarian cancer and one of its evolutionary preserved signaling pathways in order to be able to profile from an evolutionary perspective its biological behavior in order to establish a more faithful prognosis and to define optimized therapeutic sequences that will lead in the future to the improvement of oncological results.

Current state of knowledge

"The current stage of knowledge" brings into question the evolutionary theory that "Nothing in biology makes sense except in the light of evolution". Consequently, tumor clones are the equivalent of quasi-unicellular species, there is a sequential selection through an evolutionary process of cell sublineages that are increasingly abnormal, both genetically and biologically. Thus, the spatial and temporal heterogeneity of ovarian cancer is discussed. In principle, chemotherapy acts mainly on cells with an increased proliferation index, and is effective against that proportion of tumor cells in different phases of the division cycle. However, not all malignant cells are eradicated, and mutations accumulated in these cell subpopulations can induce further resistance to treatment. Up to half of high-grade ovarian cancers have defects in the repair mechanism of DNA lesions induced by chemotherapeutic agents that can alter the sensitivity to chemotherapy as well as the subsequent prognosis. Thus, it is a topic of interest the coordination between cell proliferation and programmed cell death. The mechanisms underlying this regulation are complex, and the Hippo pathway discovered almost two decades ago has important functions in cell proliferation and cell death in *Drosophila*, being one of the best preserved evolutionary signaling pathways in humans.

Personal contribution

Study 1 – Clinical characteristics associated with BRCA 1 and 2 mutations in ovarian cancer

Aim. Among the mechanisms for repairing DNA lesions, the BRCA 1 and 2 genes play an important role in the repair of double-stranded lesions through the homologous recombination pathway that is commonly used in the repair of lesions induced by platinum-based compounds. The working hypothesis in this study was to describe the clinical characteristics of platinum sensitivity associated with mutations in the BRCA 1 and 2 genes in ovarian cancer in both PDS and IDS.

Material and methods. Eighty-eight patients who were tested for the presence of BRCA 1 and 2 mutations between May 2016 and August 2018 were included in the study. The patients had histologically confirmed ovarian cancer, regardless of the stage of the disease. For the detection of mutations in the germline or somatic BRCA 1 and 2 genes, the DNA was extracted using a commercially available BRCA kit.

Results. More than 90% of the cases were high-grade serous ovarian cancer, and the majority of the patients (63, 71.6%) were diagnosed with advanced FIGO stage IIIC-IV. A total of 39 (44.3%) of patients had a germinal or somatic pathogenic BRCA1/2 mutation. PDS was offered to 51 (58%) patients. The presence of the BRCA mutation was associated with a higher frequency for PCR after NACT (OR 5.03, $p=0.033$), a higher frequency of a platinum-sensitive first or second relapse (relapse occurring at least 6 months after the last administration of platinum-based chemotherapy) (OR 3.29, $p=0.003$ and, respectively, OR 3.06, $p=0.031$) and a higher frequency of complete or partial responses after chemotherapy to the first relapse (OR 3.86, $p=0.029$) for cases with BRCA mutation compared to cases without BRCA mutation. In the advanced disease subgroup (FIGO IIIC- IV) that had NACT, the presence of BRCA mutation was associated with a significantly longer PFS1 (23 vs. 17.4 months, $p=0.049$), PFS2 (11.5 vs. 7.7 months, $p=0.019$) and OS (67.1 vs. 37.9 months, $p=0.036$) compared to cases without BRCA mutation.

Conclusions. Although we could not detect an overall survival advantage in the entire study population, patients with advanced disease and BRCAm status treated with neoadjuvant chemotherapy, had a longer PFS and OS than patients with BRCAwt status, suggesting that NACT in this patient population would have less impact in the selection of platinum-resistant subclones, thus requiring initial knowledge of BRCA status in all patients in order to optimize the primary treatment sequence, however, larger prospective studies are necessary.

Study 2 - Changes in DNA damage response markers with treatment in advanced ovarian cancer

Aim. Given the complex interaction between repair pathways, a comprehensive assessment of DNA repair effectors can provide valuable insight into DNA repair proficiency and the prognosis associated with platinum treatment in the first line. The working hypothesis was the evaluation of the relative expression of the key effectors proposed for competent DNA repair (HR: RAD51, FANCD2, ATM and BER: PAR, PARP-1), as well as error-prone repair (NHEJ: 53BP1).

Material and methods. A cohort of 147 patients with histologically confirmed epithelial ovarian cancer, treated between 2002 and 2014, were included in the study. We selected patients who had NACT and for whom sequential tumor tissue was available pre-, post-chemotherapy and/or relapse. IHC staining for all DDR markers was performed on tissue microarrays.

Results. All patients had advanced intraperitoneal disease, and 14.3% had stage IV disease at diagnosis. Before NACT, a significant number of cases had no expression of DDR markers: 60%, 60%, 24%, 21% and 14.8% were PAR, FANCD2, RAD51, ATM or 53BP1- negative. Following platinum-based neoadjuvant chemotherapy, there was an increase in the proportion of tumors with negative markers, which was statistically significant for PAR and RAD51 ($p < 0.01$). At relapse, there was a tendency for the rates of negative marker tumors to return to baseline levels, with the notable exception of 53BP1, for which the proportion of 53BP1-negative tumors increased from 15% initially to 27% at relapse, with possible relevance for the rate of response to PARPi at relapse. Cases with competent HR (RAD51+) but with error-prone NHEJ (53BP1-) on diagnosis demonstrated significantly lower PFS and OS in multivariate analysis (53BP1-/RAD51+, RH 3.13, $p = 0.009$ and RH 2.78, $p = 0.024$). Similarly, patients with double expression of biomarkers for HR post-NACT (FANCD2+/RAD51+, RH 1.89, $p = 0.05$ and RH 2.38, $p = 0.02$) or dual expression of biomarkers BER and HR (PARP-1+/RAD51+, RH 1.79, $p = 0.038$ and RH 2.04, $p = 0.034$) had a detrimental PFS and OS even after adjustment for the IDS result.

Conclusions. We have demonstrated that CO frequently demonstrates the loss of key DNA repair effectors at diagnosis – with the notable exception of PARP-1, the direct target for PARPi. Also, reassuringly, NACT did not increase the expression of the markers of effective repair of DSB and SSB, providing indirect evidence that platinum-based chemotherapy in first line did not lead to the significant selection of competent DNA repair clones. We demonstrated that RAD51+/FANCD2+ or RAD51+/PARP1+ were prognostic factors for PFS and OS with detrimental effect in multivariate analysis. Further studies should investigate whether the comprehensive assessment of both DNA repair competence and candidate markers for PARPi resistance such as loss of PARP1 or 53BP1, can predict differential response capacity to therapy.

Study 3 - Comprehensive analysis of the expression of key genes related to Hippo signaling and their prognosis impact in ovarian cancer

Aim. Hippo signaling pathway is a cascade of evolutionary conserved protein-kinases that regulate the size of organs in the course of development from arthropods to humans. A lot of evidence has confirmed the involvement of this pathway in cancer progression and metastasis. In the current study we investigated the prognostic role of mRNA expression levels of genes involved in the Hippo signaling pathway in patients with CO.

Material and methods. We performed the analysis of the gene expression profile on CO samples using the GEPIA and UALCAN database. KM plotter analyzes the individual genes together with the clinical results, including PFS and OS. A number of 29 patients with histologically confirmed CO treated at the Oncological Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca, Romania during 2018-2020 were included in this study for the validation cohort.

Results. A significantly increased statistical level for TP53 and a low level of expression for LATS1, LATS2, MST1, TAZ and TEF were observed. We observed a higher mutation rate for TP53 (66%), STK3 (11%), YAP1 (10%), and a less common mutation rate for LATS1, LATS2, MST1, TAZ, and TEF. LATS1 and TAZ expression levels decreased with stage, and we did not notice significant differences in subgroup analysis for tumor grade and TP53 mutational status. With the exception of MST1, expression levels for LATS1, LATS2, TP53, TAZ, and TEF had a significant impact ($p < 0.05$) on PFS. The high expression of MST1, LATS1 and TP53 were associated with a better prognosis, while the low expression of LATS2, TAZ and TEF was associated with a better prognosis in CO. MiRNA-mRNA interaction network revealed a correlation between the genes involved in Hippo signaling, discovering the high complexity of biological mechanisms, each gene being targeted by a significant number of Mirna. The core of the network is TP53, interconnected with one of the most powerful tumor suppressor miRNA, namely miR-34a-5p (known in the literature as being related to the CO prognosis), along with miR-25-3p, let-7c-5p, miR-15a-5p and miR-125a-5p. The qRT-PCR results in the validation cohort confirmed the previous gene expression profiles and miRNA in the GEPIA database.

Conclusions. By using online databases, we accessed expression levels and determined the prognostic roles of key genes involved in Hippo signaling that were validated on an additional cohort of patients. These results indicate that the Hippo and direct miRNA key signaling genes (miR-25-3p and miR-181c-5p) have an important prognostic value in OC. A better understanding of OC heterogeneity and complexity is needed to develop tools for new therapeutic strategies and to accurately assess the prognosis.

General conclusions

1. Patients with advanced stage disease and mutant BRCA status treated by neoadjuvant chemotherapy followed by debulking surgery had a survival without disease progression and a superior overall survival compared to patients with wildtype BRCA status.
2. The cohort of patients with mutated BRCA status has retained their platinum-sensitive phenotype at the second relapse, being about 5 times less likely to change their phenotype from platinum sensitive to platinum resistant. Thus, neoadjuvant chemotherapy in this patient population would have a minimal impact in the selection of platinum-resistant subclones, thus being imperative to initially know the BRCA status in all patients in order to optimize the primary treatment.
3. The presence of BRCA mutations was associated with a significantly higher frequency of complete pathological response after neoadjuvant chemotherapy compared to patients without a BRCA mutation, thus supporting the role of the neoadjuvant sequence in this population, thus minimizing surgical morbidity. Also, the complete pathological response may represent a surrogate for platinum sensitivity being associated with a superior PFS compared to cases where a complete pathological response has not been obtained.
4. Serous-type ovarian cancer frequently demonstrates the loss of key DNA repair effectors at diagnosis, with the notable exception of PARP-1, the direct target for PARPi. Neoadjuvant chemotherapy did not increase the expression of markers of effective repair of DNA lesions, providing indirect evidence that platinum-based chemotherapy on the front line did not lead to the significant selection of competent DNA repair clones.
5. Loss of expression for PAR and 53BP1 expression were associated with improved progression free survival suggesting that BER pathway deficiency or NHEJ pathway use could undermine the effective repair of lesions induced by platinum agents in DNA. The combined evaluation of biomarkers for effective DNA repair after NACT (RAD51+/FANCD2+ or RAD51+/PARP1+) was prognostic for progression-free survival and overall survival in multivariate analysis.
6. The presence of HRD was indicative of increasing the intratumoral immune response through the abundance of a neoantigenic load.
7. The Hippo signaling pathway provides multiple interactions with coding and non-coding genes that are regulated by a variety of mechanisms. The key genes in the Hippo signaling pathway and their direct miRNA's (miR-25-3p and miR-181c-5p) have an important prognostic value in ovarian cancer.

Originality and innovative contributions of the thesis

Considering the theoretical aspects described in this thesis, we propose for a future validation in an extended study a predominant therapeutic sequence based on neoadjuvant chemotherapy in advanced cases that present mutations in the HRR pathway, being imperative to promptly determine the BRCA status and the other HRR mediators as a reflex testing method after establishing the histopathological diagnosis. These cases present a phenotype with increased sensitivity to conventional chemotherapy manifested by improved survival, preserving sensitivity to platinum after multiple iterative series.

This thesis was among the first research studies to describe internationally the evolution under chemotherapy of multiple effectors involved in the DDR pathway. We have demonstrated that at diagnosis a significant proportion of cases show the loss of key effectors of DDR and on the evaluated batch there were no signals of concern about the development of platinum resistance through neoadjuvant chemotherapy. The usefulness of these markers also has prognostic value, and from a predictive point of view they emerge as robust biomarkers for the sensitivity to platinum and PARPi. Also, the evaluation of lymphocytic tumor infiltrate was increased in tumors that presented with HRD, through the increased frequency of DNA lesions that generate neoantigens responsible for immune activation, being among the first studies to report this link also in ovarian cancer.

There are a number of alterations of evolutionary preserved signaling pathways such as the Hippo pathway responsible for essential characteristics of tumor cells, characterizing some of the mediators involved in this network, with few studies that have described this aspect in the literature of ovarian cancer.

In conclusion, the original contributions of this thesis generated by an evolutionary perspective may be the basis for defining new therapeutic algorithms that can improve the survival of patients with ovarian cancer, beyond the predictive and prognostic value of these biomarkers.