

Povzetek

Okvara homologne rekombinacije (HRD) v tumorjih epitelnega raka jajčnikov je pomemben napovedni dejavnik odgovora na zdravljenje s PARP inhibitorji. Določanje HRD je del molekularne diagnostike pri obravnavi bolnic z rakom jajčnikov. HRD je posledica patogenih različic (mutacij) v genih BRCA1/2 in drugih genih homologne rekombinacije (HR), ter hipermetilacije promotorja BRCA1. V celicah, kjer HR ne deluje, DNA popravljajo manj natančnimi mehanizmi, kar privede do kopičenja specifičnih napak na DNA in nastanka genomske nestabilnosti. Genomska nestabilnost celic značilno za HRD lahko merimo s specifičnimi testi, ki zaznavajo genomske strukturne spremembe. V obdobju enega leta smo testiranje HRD izvedli pri 123 bolnicah z epitelnim rakom jajčnikov. HRD je bila dokazana pri več kot tretjini primerov. Od tega je bila pri dveh tretjinah primerov dokazana mutacija v BRCA1/2, pri malo manj kot tretjini metilacija promotorja BRCA1, in v manj kot desetini mutacija v drugih neBRCA HR genih.

Ključne besede: rak jajčnikov, genotipizacija, okvara homologne rekombinacije

Uvod

Okvara homologne rekombinacije v tumorjih epitelnega raka jajčnikov je pomemben napovedni dejavnik odgovora na zdravljenje s PARP inhibitorji. Določanje okvare homologne rekombinacije (angl. homologous recombination deficiency - HRD) v tumorju je zato del molekularne diagnostike pri obravnavi bolnic z rakom jajčnikov in je običajno izvedeno pred uvedbo zdravljenja s PARP inhibitorji.

Pri HRD gre za okvaro popravljalnih mehanizmov DNA. Homologna rekombinacija je vpletena v popravljanje lezij DNA, ki zaustavijo replikacijske vilice. Primer takih lezij so dvoverižni prelomi. Popravljalni mehanizmi HR (homologous recombination repair - HRR) lahko natančno, brez napak, rekonstruirajo sekvenco poškodovane DNA tako, da za vzorec/matrico uporabi sestrsko kromatido. Za uspešno delovanje procesa HRR sta pomembna neokrnjena proteina BRCA1 in BRCA2 ter številni drugi proteini vpleteni v HR.

V celicah, kjer homologna rekombinacija ne deluje, se dvoverižni prelomi popravijo z drugačnimi manj natančnimi mehanizmi, kot je npr. z mehanizmom ne-homolognega združevanja prostih koncev DNA (NHEJ – angl. non-homologous end joining repair). NHEJ poskrbi, da DNA ni več prekinjena, vendar ne more natančno obnoviti sekvence okvarjene DNA. Obsežnejše delovanje NHEJ in drugih nenatančnih popravljalnih mehanizmov privede do kopičenja specifičnih napak na »popravljeni« DNA in lahko celico privede do stanja genomske nestabilnosti. Genomska nestabilnost celic značilno za HRD lahko merimo s specifičnimi testi, ki zaznavajo genomske strukturne spremembe (large scale transitions - LST, loss of heterizyosity – LOH, telomeric alelic disbalance - NtAI) in jih ovrednotijo kot točke genomske nestabilnosti (GIS).

PARP proteini sodelujejo v različnih DNA-popravljalnih mehanizmih. Znano je njihovo delovanje v mehanizmih za popravljanje enoverižnih prelomov in manjših (enonukleotidnih) napak (single-strand break repair - SSBR, base excision repair - BER). PARP inhibitorji, naj bi

povzročili, da PARP proteini ostanejo vezani na DNA na mestu enoverižnega preloma, kar naj bi oviralo delovanje SSBR in BER in vodilo v nastanek dvoverižnih prelomov. V celici z delujočo HR, take dvoverižne prelome popravi HR in DNA se lahko nemoteno podvoji. V celici s HRD pa na takem mestu pride do zaustavitve in kolapsa replikacijskih vilic. V celicah z mutacijo v genih BRCA, ki imajo posledično nedelujoč mehanizem HR, zaviralci PARP proteinov onemogočijo alternativno popraviljanje napak na DNA in s tem prisilijo celico v nabiranje letalnih poškodb. Končni rezultat je smrt celice

V tumorskih celicah je HRD pogosto posledica patogenih različic (mutacij), ki povzročijo izgubo funkcije proteinov BRCA1, BRCA2 ter drugih v HR vpletenih proteinov (npr. RAD51C, RAD51D, PALB2), ali hipermetilacije promotorja BRCA1. HRD je lahko definirana tudi kot prisotnost mutacijskih vzorcev na DNA, ki nastanejo zaradi okvare HR, ali kot nezmožnost celic, da usmerijo in zberejo RAD51 na mestu DNA poškodb.

Evropsko združenje za medicinsko onkologijo ESMO je 2020 izdal priporočila glede testiranja okvare homologne rekombinacije. ESMO predlaga tri skupine testov za določanje HRD. (1) Določanje okvar (mutacij ali metilacije) v BRCA1/2 in drugih HR genih (RAD51C, RAD51D, PALB2- katerih vpliv na HRD ni jasen). (2) Specifični testi za detekcijo genomske strukturne spremembe, ki se nakopičijo v tumorjih z okvaro HR (določanje točk genomske nestabilnosti -GIS genomic instability scores) in (3) Funkcionalni testi okvare HRR (teoretično naj bi nudili vpogled v trenutno stanje HR – tudi če je prišlo do ponovne obnove HR).

TESTIRANJE OKVARE HOMOLOGNE REKOMBINACIJE

Na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana že od leta 2019 izvajamo genotipizacijo tumorjev epitelnega raka jajčnikov z namenom določanja mutacij v genih *BRCA1* in *BRCA2*. Od sredine leta 2023 pri tumorjih raka jajčnikov določamo HRD. Testiranje HRD poleg genotipizacije genov BRCA in drugih HR genov ter metilacije promotorja *BRCA1* in *BRCA2* v tumorju vključuje tudi test določanja za HRD značilne genomske nestabilnosti na DNA (določanje GIS).

Testi za določanje za HRD značilne genomske nestabilnosti temeljijo na določanju somatskih sprememb v številu kopij genov in neuravnoteženosti alelov preko celotnega genoma. Testi določanja HRD lahko metodološko temeljijo na sekvenciranju celotnega genoma ali na določanju enonukleotidnih polimorfizmov (SNP-jev) preko celotnega genoma.

Na rezultat HRD lahko pomembno vpliva delež tumorskih celic v vzorcu. Za primerno oceno HRD mora biti v vzorcu vsaj 30% tumorskih celic. Slabšo zanesljivost testiranja pa lahko pričakujemo tudi, je v vzorcu z manj kot 70% tumorskih celic.

V obdobju enega leta od oktobra 2023 smo testiranje HRD izvedli pri 123 bolnicah z epitelnim rakom jajčnikov. Določanje HRD je bilo neuspešno v manj kot 2% testiranj. Okvara homologne rekombinacije je bila dokazana v več kot tretjini primerov. Od tega je bila pri dveh tretjinah primerov dokazana mutacija v *BRCA1* ali *BRCA2*, pri malo manj kot tretjini pa metilacija promotorja v *BRCA1*. Manj kot 10% tumorjev z dokazano HRD je imelo mutacije v drugih ne-BRCA HR genih, med katerimi se najpogosteje pojavlja RAD51C. Tumorji z mutacijami v drugih neBRCA HR genih imajo HRD dokazan v zgolj tretjini primerov.

LITERATURA

1. Miller RE, Leary A, Scott CL, Serra V, Lord CJ, Bowtell D, Chang DK, Garsed DW, Jonkers J, Ledermann JA, Nik-Zainal S, Ray-Coquard I, Shah SP, Matias-Guiu X, Swisher EM, Yates LR. ESMO recommendations on predictive biomarker testing for homologous recombination deficiency and PARP inhibitor benefit in ovarian cancer. *Ann Oncol*. 2020 Dec;31(12):1606-1622. doi: 10.1016/j.annonc.2020.08.2102.).
2. Takaya, H., Nakai, H., Takamatsu, S. *et al*. Homologous recombination deficiency status-based classification of high-grade serous ovarian carcinoma. *Sci Rep* **10**, 2757 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59671-3>).
3. <https://www.esmo.org/guidelines/gynaecological-cancers/newly-diagnosed-andrelapsed-epithelial-ovarian-carcinoma/eupdate-newly-diagnosedepithelial-ovarian-carcinoma-treatment-recommendations>)