

Molekulárno-genetická diagnostika hereditárneho karcinómu prsníka/ovárií: výsledky testovania mutácií v génoch *BRCA1* a *BRCA2*

RNDr. Michal Konečný, PhD.¹, RNDr. Miriam Milly, PhD.¹, RNDr. Katarína Závodná, PhD.¹,
Ing. Ľudmila Vavrová, PhD.¹, MUDr. Iveta Mlkvová², doc. MUDr. Denisa Ilenčíková, PhD.¹,
doc. MUDr. Juraj Kaušitz, CSc.¹, RNDr. Zdena Bartošová, CSc.¹

¹Oddelenie lekárskej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava

²Oddelenie klinickej genetiky UNB, Nemocnica Staré Mesto, Bratislava

Germinatívne mutácie v génoch *BRCA1* a *BRCA2* sú zodpovedné za väčšinu prípadov hereditárneho karcinómu prsníka a ovárií (HBOC – hereditary breast ovarian cancer), preto ich genetické testovanie má jednoznačný klinický prínos. Napriek genetickej diagnostike oboch génov stále zostáva väčšina rodín s HBOC bez identifikovanej genetickej predispozície. Práve tento fakt viedol k rozvoju alternatívnych metód, ktoré dokážu identifikovať špeciálne typy mutácií, ako napr. veľké genómové prestavby, či predikovať prípadný patologický efekt rôznych variantov s neznámym klinickým efektom alebo identifikovať mutácie v iných tzv. nízkorizikových HBOC génoch. Na našom pracovisku sme od roku 2002 diagnostikovali gény *BRCA1/2* u 590 HBOC rodín s pozitívnou rodinnou anamnézou, pričom sme u 105 rodín dokázali prítomnosť klinicky kauzálnej mutácie, t. j. 17,8 %. V súbore 117 a 104 HBOC rodín sme dokázali prítomnosť 27 rôznych *BRCA1* a 17 rôznych *BRCA2* variantov s neznámym klinickým efektom, pričom na ich bližšiu klinickú špecifikáciu sme použili rôzne predikčné softvéry. Na základe retrospektívnej analýzy našich výsledkov sme dospeli k záveru, že najlepším klinickým kritériom na indikáciu *BRCA1* analýzy je prítomnosť karcinómu prsníka vo veku pod 40 rokov a súčasne v rámci rodinnej anamnézy asociácia s karcinómom ovárií vo veku okolo 50 rokov.

Kľúčové slová: hereditárny karcinóm prsníka a ovárií, *BRCA1*, *BRCA2*, genetická analýza, mutácia.

Molecular-genetic analysis of hereditary breast/ovarian cancer: Results of mutation testing of *BRCA1* and *BRCA2* genes

Germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes account for the majority of hereditary breast ovarian cancer (HBOC) cases. Identification of the *BRCA* pathogenic mutations has a causal clinical impact. However, still after *BRCA1* and *BRCA2* screening the most HBOC cases remain negative for any mutational event. Accordingly, in these cases raises the relevance to analyse the presence of large genomic rearrangements, unusual variants of uncertain clinical significance and finally possible presence of mutations in moderate risk HBOC genes. We analysed the *BRCA1/2* genes in 590 Slovak HBOC families from year 2002 and revealed the presence of pathogenic mutations in 105 families, what represents 17.8%. In the set of 117 and 104 HBOC families, 27 different *BRCA1* and 17 *BRCA2* variants with uncertain clinical effect were detected. To approve their closer clinical significance we predicted their effect using several prediction softwares. We observed that the best clinical criterion for *BRCA1* analysis is presence of breast cancer below 40 years in family history and with the association of presence of ovarian cancer at 50 years.

Key words: hereditary breast ovarian cancer, *BRCA1*, *BRCA2*, genetic analysis, mutation.

Onkológia (Bratisl.), 2012; roč. 7(2): 89–93

Úvod

Priemerné riziko vzniku karcinómu prsníka v bežnej slovenskej populácii je 4 – 5 % a pri karcinóme ovárií 2 %. Každoročne je pritom diagnostikovaných približne 2 000 nových prípadov karcinómu prsníka a 450 nových prípadov karcinómu ovárií (1). Na základe publikovaných údajov sa predpokladá, že 5 – 10 % týchto karcinómov vzniká na podklade genetickej predispozície. Prítomnosť z týchto prípadov má jednoznačné črty autozomálne dominantnej dedičnosti, a preto sa označuje ako hereditárny karcinóm prsníka a ovárií (HBOC). V súvislosti s týmto syndrómom boli v polovici 90. rokov 20. storočia identifikované dva vysoko-rizikové tumorsupresorové gény *BRCA1* a *BRCA2*, ktorých mutácie môžu viesť k vzniku HBOC.

Gén *BRCA1* je lokalizovaný na 17 chromozóme, obsahuje 22 exónov, ktoré kódujú 208 kDa

proteín s veľkosťou 1 863 aminokyselín. Gén *BRCA2* je lokalizovaný na 13 chromozóme, obsahuje až 27 exónov a kóduje 380 kDa proteín zložený z 3 418 aminokyselín. *BRCA1* proteín má v bunke niekoľko životne dôležitých funkcií v oprave DNA, v odpovedi bunky na poškodenie DNA, v kontrole bunkového cyklu, v procese značenia proteínov na ich degradáciu, v transkripčných aktivitách, v remodelovaní chromatinu, v odpovedi bunky na stres a v procese programovanej bunkovej smrti. Jedinou presne definovanou funkciou proteínu *BRCA2* je úloha v procese opravy dvojreťazcových zlomov DNA. Všetky tieto funkcie podčiarkujú významnú úlohu oboch génov v procese supresie tumorového procesu (2).

Väčšinu kauzálnych mutácií génov *BRCA1/2* (85 %) tvoria tzv. bodové mutácie a malé delécie či inzercie, ktoré vedú k vzniku skráteného, nefukč-

ného proteínu, a teda k zníženej schopnosti bunky opravovať chyby v DNA. Hromadenie takýchto chýb môže mať za následok, že bunka uniká kontrole bunkového cyklu a malígne sa transformuje.

Podstatná časť bodových mutácií tzv. variantov s neznámym klinickým efektom (VUS – variants of unknown clinical significance) však môže viesť iba k zámene aminokyselín v proteínoch *BRCA1/2* s nejednoznačným vplyvom na funkčnosť proteínu. Významný typ zámene aminokyselín alebo ich skupinový výskyt v géne môže pri použití predikčných softvérov naznačovať ich potenciálny klinický efekt. Predikcia efektu takýchto variantov vychádza jednak z typu zámene aminokyselín, z konzervovanosti danej sekvencie, z lokalizácie miesta mutácie v určitej funkčnej doméne proteínu, či z fyzikálnych vlastností (napr. veľkosť, náboj) pôvodnej a zamenenej aminokyseliny (3).

V niektorých prípadoch sa môžu vyskytovať osobitné poruchy veľkých častí génu, straty alebo zmnoženia niekoľkých exónov, ktoré nie sú detekovateľné štandardnými PCR metódami. Štruktúra génu *BRCA1* je charakteristická prítomnosťou množstva opakujúcich sa sekvencií v nekódujúcich častiach génu a aj v blízkosti génu *BRCA1* prítomnosťou evolučne slepej kópie génu, tzv. pseudogénu. Uvedené elementy predisponujú túto oblasť na formáciu tzv. veľkých genómových prestavieb, a to pomocou rekombinácie. Následne môže dôjsť k strate alebo zmnoženiu niekoľkých exónov, a teda k modifikácii funkcie proteínu (4).

V súčasnosti v odbornej obci prevláda názor o tzv. polygénnom modeli dedičnosti HBOC s dvomi génmi veľkého účinku (*BRCA1*, *BRCA2*) a niekoľkými génmi z nižšieho, resp. moderujúceho rizika. Medzi takéto „nízkorizikové gény“ sa zaraďujú najmä gény, ktoré v rámci vnútrobun- kových funkcií asociujú s génmi *BRCA1/2* (napr. ATM, ATR, CHEK2, STK11/LBK1, TP53, RAD50, RAD51, BARD1, BAP1, BACH1, CtIP, HDAC1/2, MSH2/6, MLH1, PCNA, PTEN, RNAPol II) (5).

Naša práca sa zameriava na komplexnú diagnostiku všetkých druhov mutácií v génoch *BRCA1* a *BRCA2* zodpovedných za vznik HBOC. Ďalším cieľom je retrospektívna analýza klinických kritérií, ktoré by viedli k lepšiemu odlíšeniu hereditárneho karcinómu prsníka. Na záver sa snažíme interpretovať klinický efekt variantov s neznámym klinickým vplyvom, pretože dôkaz patologického efektu mutácie ovplyvňuje preventívny manažment a liečbu nielen pacientky, ale aj jej zdravých rodinných príbuzných.

Materiál a metódy

Selekcia rodín a vzoriek

Všetky testované pacientky podpísali pred analýzou v rámci genetickej konzultácie informovaný súhlas. Následne boli po splnení indikačných kritérií zohľadňujúcich početnosť karcinómov a vek nástupu ochorenia klinickým genetikom odoslané na DNA analýzu génu *BRCA1*, resp. *BRCA2*. Publikované dáta sú kolektované od roku 2002.

V súčasnosti platné indikačné kritériá sú:

- traja pokrvní príbuzní postihnutí karcinómom prsníka alebo vaječníka, pričom aspoň v jednom prípade ochorenie diagnostikované do 50 rokov
- dvaja príbuzní (I. st.) s karcinómom prsníka alebo vaječníka
 - ak sú obidvaja pod 50 r.
 - ak je jeden muž
 - ak je jeden s bilaterálnou alebo duplexnou formou ochorenia

- ak je jeden pod 50 r. a ďalší príbuzný (I. st.) má nádorové ochorenie zo spektra HBOC
- jeden postihnutý s bilaterálnou formou karcinómu prsníkov alebo vaječníkov alebo duplexnou formou ochorenia
 - jeden postihnutý s karcinómom prsníka – muž
 - jeden postihnutý s karcinómom prsníka alebo vaječníka do veku 35 rokov
Genomická DNA bola izolovaná zo vzorky 200 – 500 µl periférnej krvi.

PCR amplifikácia a detekcia mutácií

Na diagnostiku mutácií v génoch *BRCA1/2* boli od roku 2002 použité rozličné prístupy. Do roku 2008 boli oba gény analyzované kombináciou metódy PCR amplifikácie, ktorá slúži na niekoľkonásobné namnoženie cieľového úseku DNA a metódy SSCP, ktorá detekuje prítomnosť mutácií nepriamo. Citlivosť metódy SSCP však dosahovala iba 70 – 80 %, preto bol tento prístup neskôr modifikovaný. Oba gény však museli byť vzhľadom na svoju veľkosť rozdelené na viaceré PCR fragmentov, gén *BRCA1* na 38 a gén *BRCA2* až na 52 PCR fragmentov, pričom každý fragment bol analyzovaný separátne. Od roku 2009 boli oba gény analyzované kombináciou metód PCR amplifikácie a priamej sekvenácie DNA, ktorá má v prípade zárodočných mutácií citlivosť 100 %. Týmto prístupom sa nám podarilo pri zachovaní rozsahu vyšetrenia zredukovať množstvo analyzovaných fragmentov na 29 pri *BRCA1* a 36 pri *BRCA2* géne.

MLPA analýza

Vzhľadom na prítomnosť veľkých genómových prestavieb v génoch *BRCA1/2* sme neskôr zaviedli špecifickú metódu, tzv. MLPA analýzu (Multiplex ligation-dependent probe amplification), ktorá semikvantitatívne detekuje veľkosť a množstvo každého PCR produktu. Následne pri softvérovom porovnaní s kontrolnou vzorkou dokáže identifikovať časť génu postihnutú stratou alebo zmnožením viacerých exónov.

Predikčné softvérové analýzy

V prípade identifikácie variantov s neznámym klinickým efektom v génoch *BRCA1* a *BRCA2* sme následne pristúpili k ich analýze, a to na základe porovnania fyzikálnych vlastností zmenených aminokyselín, ale aj pomocou rôznych voľne dostupných online predikčných softvérov, t. j. Align-GVGD (<http://agvgd.iarc.fr/agvgdinput.php>), PMut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/Pmut/>) a PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>). Na záver sme v prípade potenciálne patologických variantov vykonali segregáčnú analýzu variantu s ochorením

v rámci postihnutej rodiny, t. j. koreláciu identifikovaného variantu s výskytom ochorenia u jednotlivých členov rodiny.

Výsledky a diskusia

Celkovo bolo od roku 2002 použitím rôznych molekulárno-genetických metodických prístupov vyšetrených 590 HBOC rodín, pričom sme prítomnosť patologickej mutácie identifikovali v 105 rodinách (17,8 %). Väčšina 86 pozitívnych rodín, resp. dokázaných mutácií bola v géne *BRCA1* (25 rôznych typov), pričom v géne *BRCA2* to bolo 12 rodín (9 typov). V 7 rodinách bola dokázaná tzv. veľká genómová prestavba (4 rôzne typy), v géne *BRCA1* 6 rodín, v géne *CHEK2* jedna rodina. V porovnaní s prácami najmä v oblasti stredoeurópskeho regiónu bola detekovaná hladina patologických mutácií v slovenskej populácii nižšia, napr. v českej populácii bola detekovaná frekvencia na úrovni 29,1 % (6). Uvedený rozdiel môže byť ovplyvnený viacerými faktormi, napr. kompozíciou súboru selektovaných rodín, rozdielmi v indikačných kritériách, veľkosťou vyšetřovaného súboru či metodickými rozdielmi. Porovnateľná frekvencia mutácií bola detekovaná a reportovaná v rámci sicílskej 16 % (7) či španielskej populácie 17,1 % (8).

Klinicky kauzálne mutácie v géne *BRCA1*

Z pohľadu typov mutácií na úrovni DNA až 83 % patologických mutácií v géne *BRCA1* tvoria mutácie skracujúce proteín, t. j. vedúce k vzniku predčasného stop kodónu (delécie, inzercie a nonsense mutácie). Zvyšných 17 % tvoria mutácie typu missense vedúce k zámene aminokyselín a tzv. zosťrihové mutácie vedúce k nesprávne zosťrihu DNA a skladaniu proteínu.

Z pohľadu lokalizácie väčšina mutácií (54 %) bola lokalizovaná v exóne 11 génu *BRCA1*, nasledovali podľa počtu pozitívnych rodín mutácie v exóne 20, 5, 13, 2, 24, 16, 18 a 3. Prítom mutácie v exónoch 2, 5, 11, 13 a 20 tvoria 75 % všetkých patologických mutácií identifikovaných v slovenskej HBOC populácii. Spomedzi jednotlivých mutácií bola najčastejšie detekovaná duplikácia c.5266dupC v exóne 20 (37 %) a mutácia p.Cys61Gly (zámena cysteínu za glycín v kodóne 61) v exóne 5 (16 %).

Na základe uvedených výsledkov (tabuľka č. 1) ako aj publikovaných dát môžeme patologické *BRCA1* mutácie z pohľadu ich frekvencie výskytu rozdeliť do týchto skupín:

- Frekvencované, považované za slovenské zakladateľské mutácie.
- Relatívne časté mutácie „zavlečené“ do slovenskej populácie zo susedných krajín.
- Zriedkavé mutácie špecifické pre slovenskú HBOC populáciu.

Tabuľka 1: Spektrum *BRCA1/2* patologických mutácií v skupine slovenských HBOC rodín. Skratky: FS – frame shift mutácia; IS – intrónová zostrihová mutácia; MS – missense mutácia; NS – nonsense mutácia; X – stop kodón

Č	Opis mutácie na úrovni nukleotidu	Opis mutácie na úrovni proteínu	Exón	Počet rodín	Výskyt v populáciách
BRCA1 gén					
1	c.68_69delAG	FS; p.Glu23ValfsX16	2	4	aškenazský Židia
2	c.80+4del4	IS, strata exónu 2	2/3	1	Slovensko
3	c.115T>C	MS; p.Cys39Arg	3	1	stredovýchodná Európa
4	c.181T>G	MS; p.Cys61Gly	5	14	Európa a USA
5	c.843_846del4	FS; p.Ser281SerfsX15	11	3	Rakúsko
6	c.1166delG	FS; p.Ser389MetfsX4	11	1	Slovensko
7	c.1687C>T	NS; p.Gln563X	11	1	Česko, Rakúsko, Nemecko
8	c.1938_1947del10	FS; p.Ser646ArgfsX2	11	2	Slovensko
9	c.1953_1956del4	FS; p.Lys651LysfsX48	11	1	západná Európa, USA
10	c.2068delA	FS; p.Lys690LysfsX9	11	2	Nemecko
11	c.2488_2497dup10	FS; p.Lys833LysfsX2	11	1	Česko
12	c.2921T>A	NS; p.Leu974X	11	2	Rakúsko
13	c.3016_3019del4	FS; p.His1006GlnfsX16	11	1	Rakúsko
14	c.3018_3021del4	FS; p.His1006GlnfsX16	11	1	západná Európa
15	c.3700_3704del5	FS; p.Val1234GlnfsX7	11	4	stredovýchodná Európa, Poľsko
16	c.3770_3771del2	FS; p.Glu1257GlyfsX8	11	1	stredovýchodná Európa
17	c.4065_4068del4	FS; p.Asp1355LysfsX9	11	2	Nórsko, Anglicko, francúzska Kanada, stredná Európa
18	c.4243delG	FS; p.Glu1415LysfsX3	13	3	Slovensko, Nemecko
19	c.4327C>T	NS; p.Arg1443X	13	1	Francúzsko, francúzska Kanada, Fínsko
20	c.4339C>T	NS; p.Gln1447X	13	1	Afrika, Česko
21	c.4986+4A>T	IS, exon 16 skipping	16/17	2	stredovýchodná Európa
22	c.5084_5085del2	NS; p.Phe1695CysfsX2	18	1	aškenazský Židia, stredná Európa
23	c.5251C>T	NS; p.Arg1751X	20	2	Fínsko, Grécko, západná Európa
24	c.5266dupC	FS; p.Gln1756ProfsX73	20	32	Európa, Aškenazi židia
25	c.5511G>A	NS; p.Trp1837X	24	2	Česko, Francúzsko
BRCA2 gén					
1	c.3G>A	MS; p.Met1Ile	2	1	západná Európa
2	c.1408insG	FS; p.Glu470GlufsX5	10	1	nešpecifikované
3	c.2806_2809del4	FS; p.Lys936LysfsX23	11	1	západná Európa, Španielsko, Česko
4	c.3076A>T	NS; p.Lys1026X	11	2	Česko
5	c.5645C>A	NS; p.Ser1882X	11	2	západná, stredná Európa
6	c.5946delT	FS; p.Ser1982ArgfsX21	11	1	aškenazský Židia
7	c.6589delA	FS; p.Thr2197LeuX7	11	1	Slovensko
8	c.9098dupA	FS; p.Thr3033AsnfsX9	23	1	aškenazský Židia, Maďarsko, USA, Španielsko, západná Európa
9	c.9403delC	FS; p.Leu3135PhefsX27	25	2	Poľsko, Česko

■ Zriedkavé mutácie špecifické pre česko-slovenskú HBOC populáciu.

■ Iné vzácne mutácie opísané v nesusediacich populáciách.

Rovnaké rozloženie identifikovaných *BRCA1* patologických mutácií bolo v regióne strednej Európy reportované v rakúskej (9), poľskej (10) a českej (6) HBOC populácii, čo naznačuje zakladateľský (founder) efekt najmä mutácií c.5266dupC a p.Cys61Gly v slovanských populáciách stredoeurópskeho regiónu (11).

Zvyšok patologických mutácií (25 %) bol dokázaný u jednej alebo dvoch rodín. Niektoré mutácie boli tiež dokázané v susedných populáciách, napr. v českej populácii Macháčková a kol. (6) identifikovala 6 rovnakých mutácií (p.Cys39Arg, p.Gln563X, c.2488_2497dup10, c.3700_3704del5 a p.Gln1447X). Naopak v rámci slovenskej HBOC populácie existuje skupina tzv. vnesených *BRCA1* mutácií, ktorá bola publikovaná výlučne vo vzdia-

lenejších a nepříbuzných populáciách napr. vo švédskej (12) alebo francúzskej (13).

Skupinu populačne špecifických mutácií predstavujú mutácie c.1166delG, c.1938_1947del10, c.80+4del4 publikované iba v slovenskej HBOC populácii (14, 15). Na dôkaz patogenicity mutácie c.80+4del4 sme uskutočnili jednak segregáciu analýzu s ochorením, a jednak cDNA sekvenčnú analýzu, pričom oba prístupy potvrdili jej patologický efekt, ktorý spočíva v nesprávnom skladaní *BRCA1* proteínu. Mutácia má za následok stratu celej sekvencie exónu 2, t. j. 47 aminokyselín. Translácia proteínu sa tak začína až na Metioníne v pozícii 261 v exóne 5 a vedie k vzniku aberantne skráteného nefunkčného proteínu (15).

Klinicky kauzálne mutácie v géne *BRCA2*

Patologické mutácie v géne *BRCA2* boli identifikované v 12 rodinách (10 %), pričom však doteraz bol gén *BRCA2* vyšetrený len u 120 rodín. Dôvod je,

že vyšetrenie génu *BRCA2* bolo zavedené až v roku 2008 a nie je paralelné s vyšetrením génu *BRCA1*. Zaujímavé je, že takmer polovica identifikovaných *BRCA2* mutácií bola opísaná aj v českej HBOC populácii (6, 16). V géne *BRCA2* bola dokázaná nová delečná mutácia c.6589delA, ktorá bola opísaná iba slovenskej HBOC populácie. V rámci segregáčnej analýzy mutácia v rodine jednoznačne segregovala s ochorením. Mutácia postihuje kodón pre aminokyselinu treonín v pozícii 2197 a generuje predčasný stop kodón v oblasti funkčnej domény dôležitej na opravu DNA (15).

Typ diagnostikovaného karcinómu a priemerný vek v čase diagnózy

Najvyššiu frekvenciu detekovaných *BRCA1* patologických mutácií (33 %) sme pozorovali v skupine rodín s diagnostikovaným duplexným karcinómom prsníka a ovárií. Nasledovala skupina rodín s karcinómom prsníka asociovaným s karcinómom

ovárií v rámci rodinnej anamnézy (31,5 %), potom skupina rodín s diagnostikovaným bilaterálnym karcinómom prsníka (13 %). Kauzálné mutácie boli ďalej identifikované v 12 % rodín s unilaterálnym ovariálnym karcinómom a nakoniec u 10 % rodín s unilaterálnym karcinómom prsníka.

V rámci skupiny rodín s *BRCA2* patologickými mutáciami nebol pozorovateľný jednoznačný posun v smere niektorého typu karcinómu. Najviac, 14 %, rodín sme dokázali v skupine s bilaterálnym karcinómom prsníka, nasledovalo 12 % v skupine s unilaterálnym karcinómom prsníka. Výskyt karcinómu prsníka u muža bol asociovaný s patologickou mutáciou v *BRCA2* géne iba v rámci jednej rodiny.

V súlade s publikovanými údajmi iných štúdií (6, 7) je spoločná prítomnosť ovariálneho a prsníkového karcinómu v rodinnej anamnéze rozhodujúcim faktorom na *BRCA1* testovanie a predstavuje najsilnejšie indikačné kritérium. Taktiež prítomnosť bilaterálneho ovariálneho a bilaterálneho karcinómu prsníka stále predstavuje silnejšie indikačné kritérium ako výlučná prezentácia unilaterálneho karcinómu prsníka.

U pacientok s *BRCA1* patologickou mutáciou sme pozorovali priemerný vek v čase diagnózy karcinómu prsníka, ktorý bol 42,7 roka (rozsah 21 až 75 rokov). Pritom priemerný vek diagnostikovania unilaterálneho karcinómu prsníka bol 40,7 roka (21 – 66) a bilaterálneho karcinómu prsníka 39,7 roka (30 – 46). Priemerný vek diagnostikovania duplexného karcinómu prsníka a ovária bol zaznamenaný na úrovni 47,5 roka (41 – 50), pri unilaterálnom ovariálnom karcinóme na úrovni 51,2 roka (40 – 75).

Pri celkovom porovnaní priemerného veku u pacientok s karcinómom prsníka vidíme, že vek v čase diagnózy pri *BRCA1* negatívnych prípadoch je signifikantne vyšší (44 rokov, 21 – 70) ako pri pozitívnych *BRCA1* prípadoch (40 rokov, 21 – 66). Prekvapujúce však je, že priemerný vek v čase diagnózy ovariálneho karcinómu je pri *BRCA1* negatívnych prípadoch takmer 45 rokov (22 – 75), ale pri pozitívnych prípadoch je to až takmer 50 rokov.

Tieto pozorovania naznačujú, že prítomnosť *BRCA1* patologickej mutácie v rámci rodinnej anamnézy vo väčšej miere súvisí s prítomnosťou karcinómu prsníka, ktorý bol diagnostikovaný okolo 40 rokov v asociácii s karcinómom ovárií vo veku okolo 50 rokov. Taktiež možno konštatovať, že výskyt sporadického karcinómu ovárií vo veľmi mladom veku, približne pod 40 rokov bez inej rodinnej anamnézy pravdepodobne nie je vhodná indikácia na testovanie *BRCA1* mutácií a môže vo väčšej miere súvisieť s negenetickými rizikovými faktormi (prostredie, životný štýl, fajčenie, kontraceptíva, stres).

V prípade pacientok s *BRCA2* patologickou mutáciou sme zaznamenali priemerný vek v čase diagnózy unilaterálneho karcinómu prsníka vo veku 52,7 roka (37 – 59). Ostatné skupiny pacientok v rámci jednotlivých diagnóz boli na zistenie tohto údaja málopočetné.

Veľké genómové prestavby v génoch *BRCA1, BRCA2, CHEK2*

Veľké genómové prestavby sme doteraz analyzovali v skupine 80 HBOC rodín negatívnych na prítomnosť mutácií v génoch *BRCA1/2*, pričom analýza prebiehala pri oboch génoch naraz. Pomocou MLPA analýzy sme testovali všetky exóny génu *BRCA1, BRCA2* a vybrané časti génu *CHEK2* (promótor, exón 9, 10) ako aj prítomnosť mutácie 1100delC v géne *CHEK2*. Celkovo sme identifikovali 4 rôzne typy mutácií v 7 rodinách (8,9 %), t. j. v géne *BRCA1* deléciu exónov 21 – 22 u dvoch, deléciu exónov 17 – 19 u jednej, deléciu celej alely génu u troch a deléciu exónu 9 – 10 génu *CHEK2* u jednej HBOC rodiny. Žiadna genómová prestavba nebola detekovaná v géne *BRCA2*. V porovnaní s českou (5,8 %) (17) či nemeckou populáciou (5,3 %) (18) je záchyt genómových prestavieb v našej populácii takmer dvojnásobný. Vašíčková a kol. (17) opísala rovnaký typ delécie exónov 21 – 22 génu *BRCA1*, pričom patologický efekt mutácie spočíva v delícii 43 aminokyselín v oblasti konzervovanej BRCT funkčnej domény. Zriedkavá genómová delécia celej jednej *BRCA1* alely bola publikovaná okrem slovenskej populácie (19) aj v španielskej (20) a nemeckej HBOC populácii (21).

Variety s neznámym klinickým významom v génoch *BRCA1/2*

Spomedzi všetkých 590 HBOC rodín sme identifikovali 19 rôznych typov variantov s neznámym klinickým efektom (VUS, variants of uncertain clinical significance) v súbore 117 HBOC rodín (20 %). Frekvencia *BRCA1/2* variantov na úrovni 20 % patrí medzi najvyššie spomedzi publikovaných údajov (3).

Veľký rozdiel v záchytech variantov v slovenskej populácii pripisujeme využitiu sekvenačnej analýzy (citlivosť 100 %) v testovaní génov *BRCA1/2*, kým v iných štúdiách boli použité postupy s nižšou citlivosťou. Celkovo sme v našom súbore identifikovali 4 doteraz nereportované varianty (p.Asn630Asp, p.Asn916Thr, p.Thr1246Asn v *BRCA1* a p.Ser2052Leu v *BRCA2*).

Predikčnú analýzu *BRCA1/2* variantov sme založili na porovnaní fyzikálnych vlastností zamenených aminokyselín a predikcii softvérov Align-GVGD, Pmut a Polyphen (tabuľka č. 2).

Na základe výsledkov môžeme usudzovať, že varianty p.Arg841Trp, p.Glu1346Gly, p.Ser1512Ile v *BRCA1* a p.Gly2274Val, p.Trp2626Cys, p.Val2908Gly v *BRCA2* reprezentujú potenciálne patologické alterácie s kauzálnym klinickým efektom. Uvedené výsledky by však mali byť potvrdené segregačnou analýzou variantov s ochorením. Segregačná analýza však predstavuje problematickú fázu určovania klinického efektu daného variantu, a to najmä vzhľadom na ťažkosti s komunikáciou s pacientkami, časté úmrtia pacientok, resp. nositeľov variantu či nízku informatívnosť rodiny (malé, nerozvetvené rodiny, nedostatok informácií o príbuzných).

Komplexná interpretácia variantov predstavuje problém, keďže predikcia efektu v rámci predikčných softvérov varíruje podľa typu použitého softvéru. Komplexné hodnotenie by malo zahŕňať kombináciu viacerých prístupov založených napr. na segregačných analýzách, analýzách straty heterozygotnosti (LOH) v nádorovom tkanive, stanovení frekvencie prítomnosti variantu v súbore zdravých kontrol, in silico predikčných analýzách aminokyselínovej zámery a funkčných testov transkripcie, translácie a proteínovej stability (3). Na základe našich skúseností (definovanie klinického efektu mutácie c.80+4del4) odporúčame ako minimálny štandardný prístup kombináciu predikcie pomocou viacerých softvérov, segregačnej analýzy a príp. cDNA analýzy.

Záver

Molekulárno-genetická analýza génov *BRCA1* a *BRCA2* v súbore 590 slovenských HBOC rodín odhalila prítomnosť kauzálnych klinických mutácií v 105 rodinách (17,8 %), pričom najčastejšie zastúpenými boli mutácie génu *BRCA1* lokalizované v exónoch 2, 5, 11, 13 a 20, ktoré predstavovali 75 % *BRCA1* kauzálnych mutácií. Prínos tejto informácie pre ďalší preventívny manažment a liečbu pacientok, ale aj zdravých rodinných príslušníkov – nosičov mutácie, je veľmi dôležitý. V nami hodnotenom súbore sme pozorovali popri familiárnom výskyte karcinómu veľmi dôležitý marker na testovanie génu *BRCA1*, ktorým je vek v čase diagnózy karcinómu prsníka okolo 40 rokov a karcinómu ovárií okolo 50 rokov ako aj spoločný výskyt oboch typov karcinómov v rodine.

Prítomnosť variantov s neznámym klinickým efektom v génoch *BRCA1/2* si vyžaduje komplexnejšiu genetickú analýzu a úzku spoluprácu klinického a molekulárneho genetika. To značí oslovenie čo najväčšieho počtu členov danej rodiny, následné vykonanie segregačnej analýzy, t. j. korelácie medzi výskytom príslušného variantu a nádorových ochorení v rodine a príp. ďalšej molekulárnej DNA/RNA

Tabuľka 2: Súbor identifikovaných variantov s neznámym klinickým efektom v génoch *BRCA1/2* a bližšia charakterizácia jednotlivých substitúcií. Skratky: BIC – databáza Breast Cancer Information Core; neu – neutrálny; pato – patologický; pravdep – pravdepodobný

Variant	Normálna aminokyselina		Mutantná aminokyselina		PolyPhen soft.	AGVGD soft.	Pmut soft.	Počet opisov (BIC)
	Náboj	Molekulárna veľkosť	Náboj	Molekulárna veľkosť				
BRCA1								
p.Gln356Arg	kyslá, hydrofilná	146.15	bázická	174.2	pravdep 2.1	C35	0.20 neu (5)	92x
p.Arg496His	bázická	174.2	bázická, aromatická	155.16	benígny 0.8	C25	0.46 neu (0)	90x
p.Arg496Cys	bázická	174.2	hydrofóbná	121.2	benígny 0.8	C65	0.89 pato (7)	43x
p.Pro568Arg	polárna, hydrofóbná	115.13	bázická	174.2	benígny 1.4	C65	0.31 neu (3)	1x
p.Asn630Asp	kyslá, hydrofilná	132.12	kyslá	133.1	možný 2.0	C15	0.05 neu (9)	0
p.Gln804His	kyslá, hydrofilná	146.15	bázická, aromatická	155.16	benígny 0.1	C15	0.13 neu (7)	15x
p.Arg841Trp	bázická	174.2	hydrofóbná, aromatická	204.2	možný 1.5	C65	0.68 pato (3)	>100x
p.Asn916Thr	kyslá, hydrofilná	132.12	hydrofilná, polárna	119.12	benígny 1.3	C55	0.55 pato (1)	0
p.Ser1040Asn	hydrofilná, polárna	105.09	kyslá, hydrofilná	132.12	benígny 0.4	C45	0.28 neu (4)	43x
p.Lys1109Asn	bázická	146.2	kyslá, hydrofilná	132.12	možný 1.7	C65	0.19 neu (6)	5x
p.Val1181Ile	hydrofóbná, alifatická	117.15	hydrofóbná	131.2	benígny 0.4	C25	0.08 neu (8)	3x
p.Thr1246Asn	hydrofilná, polárna	119.12	kyslá, hydrofilná	132.12	benígny 1.4	C55	0.33 neu (3)	0
p.Glu1345Lys	kyslá	147.13	bázická	146.2	možný 1.7	C55	0.28 neu (4)	4x
p.Glu1346Gly	kyslá	147.13	hydrofilná, polárna	75.07	pravdep 2.2	C65	0.75 pato (5)	>100x
p.Ser1512Ile	hydrofilná, polárna	105.09	hydrofóbná	131.2	pravdep 2.1	C65	0.58 pato (1)	53x
p.Met1652Ile	hydrofóbná	149.2	hydrofóbná	131.2	benígny 1.1	C0	0.33 neu (3)	39x
p.Gly1738del	hydrofilná, polárna	75.07			možný 1.8	--		3x
BRCA2								
p.Lys1025Asn	bázická	146.2	kyslá, hydrofilná	132.12	benígny 1.5	C65	0.21 neu (5)	3x
p.Val1643Ala	hydrofóbná, alifatická	117.15	hydrofóbná, polárna	89.1	benígny 1.2	C65	0.25 neu (5)	3x
p.Thr1915Met	hydrofilná, polárna	119.12	hydrofóbná	149.2	možný 1.6	C65	0.32 neu (3)	7x
p.Ser2052Leu	hydrofilná, polárna	105.09	hydrofóbná, alifatická	131.2	možný 1.9	C65	0.83 pato (6)	0
p.Gly2274Val	hydrofilná, polárna	75.07	hydrofóbná, alifatická	117.15	pravdep 2.4	C65	0.85 pato (6)	13x
p.Trp2626Cys	hydrofóbná, aromatická	204.2	hydrofóbná	121.2	pravdep 3.5	C65	0.96 pato (9)	
p.Val2908Gly	hydrofóbná, alifatická	117.15	hydrofóbná, polárna	75.07	pravdep 2.2	C65	0.85 pato (7)	7x

analýzy. Výsledkom úzkej spolupráce je zlepšenie klinickej interpretácie takýchto typov mutácií a skorý záchyt nositeľov v postihnutej rodine.

Literatúra

- Ondrusova M, Plesko I, Safaei-Diba Ch. a spol. Comprehensive analysis of incidence and mortality of malignant tumors in the Slovak Republic [online]. National Cancer Registry of the Slovak Republic, NHIC, Bratislava, 2007; Dostupné na www: <http://www.nor-sk.org/>.
- Narod SA, Salmena L. BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer. *Discov Med* 2011; 12(66): 445–53.
- Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S, et al. Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of unknown clinical significance. *Cancer Res* 2006; 66(4): 2019–27.
- Sluiter MD, van Rensburg EJ. Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res Treat*. 2011; 125: 325–49.
- Meindl A, Ditsch N, Kast K, et al. Hereditary breast and ovarian cancer – new genes, new treatments, new concepts. *Dtsch Arztebl Int*. 2011; 108(19): 323–30.
- Machackova E, Foretova L, Lukesova M, a spol. Spectrum and characterisation of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2008; 8: 140.
- Russo A, Calò V, Agnese V, et al. BRCA1 genetic testing in 106 breast and ovarian cancer families from Southern Italy (Sicily): a mutation analyses. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 105(3): 267–76.

- Llort G, Munoz CY, Tuser MP, et al. Low frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain. *Hum Mutat*. 2002; 19: 307.
- Wagner TM, Moslinger RA, Muhr D, et al. BRCA1-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific BRCA1 mutations and pathological characteristics. *Int J Cancer*. 1998; 77: 354–60.
- Perkowska M, Brozek I, Wysocka B, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in breast-ovarian cancer families from northeastern Poland. *Hum Mutat*. 2003; 2: 553–554.
- Hamel N, Feng BJ, Foretova L, et al. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5385insC) in European populations. *Eur J Hum Genet*. 2011; 19: 300–306.
- Bergman A, Flodin A, Engwall Y, et al. A high frequency of germline BRCA1/2 mutations in western Sweden detected with complementary screening techniques. *Fam Cancer*. 2005; 4: 89–96.
- Vežina H, Durocher F, Dumont et al. Molecular and genealogical characterization of the R1443X BRCA1 mutation in high-risk French-Canadian breast/ovarian cancer families. *Hum Genet*. 2005; 117: 119–132.
- Čierniková S, Tomka M, Sedláková O, a spol. The novel exon 11 mutation of BRCA1 gene in a high-risk family. *Neoplasma*. 2003; 50(6): 403–407.
- Konecny M, Vizvaryova M, Zavodna K, a spol. Identification of a novel mutations BRCA1*c.80+3del4 and BRCA2*c.6589delA in Slovak HBOC families. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 119(1): 233–237.
- Foretova L, Machackova E, Navratilova M, a spol. BRCA1 and BRCA2 mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian cancer in the Czech Republic. *Hum Mutat*. 2004; 23: 397–398.

- Vasickova P, Machackova E, Lukesova M, a spol. High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangements in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic. *BMC Med Genet* 2007; 8: 32.
- Hartmann C, John AL, Klaes R, et al. Large BRCA1 gene deletions are found in 3% of German high-risk breast cancer families. *Hum Mutat*. 2004; 24(6): 534.
- Konecny M, Zavodna K, Vranova V, a spol. Identification of rare complete BRCA1 gene deletion using a combination of SNP haplotype analysis and array-CGH techniques. *Breast Cancer Res Treat*. 2008; 109: 581–583.
- De la Hoya M, Gutiérrez-Enriquez S, Velasco E, et al. Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Clin Chem*. 2006; 52: 1480–1485.
- Engert S, Wappenschmidt B, Betz B, et al. MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17 and occurrence in single early-onset cases. *Hum Mutat*. 2008; 29(7): 948–58.

RNDr. Michal Konečný, PhD.
Oddelenie lekárskej genetiky,
Onkologický ústav sv. Alžbety
Heydukova 10, 812 50 Bratislava
mkonecny@ousa.sk

