

Rozsáhlé intragenové přestavby v genech BRCA1 a CHEK2 způsobující genetickou predispozici ke vzniku nádoru prsu v České republice.

Macháčková E., Vašíčková P., Lukešová M., Navrátilová M., Pavlů H., Kosinová V., Kuklová J., Foretová L.

Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, Masarykův onkologický ústav, Brno

Úvod

Nádor prsu představuje komplexní multifaktoriální onemocnění, jehož vznik je podmíněn interakcí genetických faktorů a vlivu prostředí. V naší populaci přibližně každá desátá žena onemocní během svého života nádorem prsu. Výskyt nádoru prsu v rodinné anamnéze ženy je bezesporu významným rizikovým faktorem.

Diagnózu hereditární formy nádoru prsu lze stanovit v případě rodiny, kde je evidováno několik postižených příbuzných, jejichž věk v době diagnózy je výrazně nižší než v případě sporadických nádorů prsu, je zde zvýšené riziko bilaterálního nádoru a často přidružený nádor vaječníků. U převážné části rodin s mnohočetným výskytem nádoru prsu v několika generacích lze segreganční analýzou prokázat autozomálně dominantní dědičnost. Takovéto případy mohou být způsobeny monogenní genetickou predispozicí a tvoří jen asi 5-7% z celkového počtu diagnostikovaných nádorů prsu.

Vysoce penetrantní genetická predispozice je nejčastěji způsobena poškozením genu BRCA1 nebo BRCA2. Zdědění jedné poškozené alely genu BRCA1 nebo BRCA2 je dostatečné k vyvolání nádorové predispozice. Kumulativní riziko pro vznik nádoru prsu je u nosiček BRCA1 nebo BRCA2 mutace odhadováno na 65-85% do 70 let věku pacientky, přičemž pacientka která již nádorem prsu onemocněla má až 50% riziko vzniku bilaterálního nádoru do věku 70 let (Easton et al., 1995, Ford et al., 1998, Antoniou 2003). Kumulativní riziko pro vznik nádoru ovaria u nosiček BRCA1 mutace je odhadováno až na 63% do 70 let věku pacientky (Easton et al., 1995), u nosiček BRCA2 mutace je toto riziko odhadováno na maximálně 27% (Thompson et al., 2001).

Nádorové onemocnění je vysoce komplexní onemocnění, kdy interakcí různých genetických faktorů může docházet k výraznému navýšení individuálního rizika pro vznik nádorového onemocnění. Různé mutace v CHEK2 genu mohou mít rozdílnou expresivitu a penetranci. Celosvětově rozšířená mutace 1100delC v genu CHEK2 v heterozygotním stavu je popisována jako nízkopetrantní alela zvyšující 2-4 násobně riziko vzniku nádoru prsu (Offit et al., 2003). Některé studie popisují také zvýšenou predispozici ke vzniku nádoru prostaty, štítné žlázy, plic, ovaria, mozkových nádorů a osteosarkomů (Cybulski et al., 2004). V současné době byla popsána genomická delece exonů 9 a 10 u vysoce rizikových patientek s nádorem prsu v USA u rodin československého původu (Welsch et al., 2006).

V laboratoři epidemiologie a genetiky nádorů Masarykova onkologického ústavu v Brně je na základě výběrových kritérií prováděn mutační screening BRCA1 a BRCA2 genů u rizikových patientek s nádorem prsu a/nebo ovaria s pozitivní rodinnou anamnézou nebo diagnostikované v mladém věku. Procento záchytu mutace závisí na přísnosti výběrových kritérií. V průměru u cca 60% vysoce rizikových rodin s výskytem nádoru prsu a ovaria bývá standardním screeningem zachycena patogenní mutace. U rizikových rodin s výskytem nádoru prsu (bez asociace s ovarialními nádory) se záchyt patogenní mutace pohybuje mezi 25-30%.

Záchyt patogenních mutací v genech BRCA1 a BRCA2 u vysoce rizikových probandů však závisí také na zvolených postupech molekulárního genetického vyšetření. Částečná či úplná delece nebo amplifikace velkých oblastí přesahujících jednotlivé exony nemusí být detekována vlivem přítomnosti wild type alely způsobující pozitivní PCR signál a tím pádem falešně negativní výsledek.

O spektru a frekvenci intragenových přeskupení v genech BRCA1 nebo BRCA2 u pacientů s dědičnou formou karcinomu prsu a/nebo ovaria v české populaci nebylo doposud nic známo.

Vyšetřovaná skupina a postupy

Vyšetření na přítomnost velkých intragenových přestaveb v genech BRCA1, BRCA2 a CHEK2 genu bylo provedeno u probandů z nejrizikovějších rodin s předpokládaným dědičným syndromem nádoru prsu a/nebo ovaria, u kterých nebyla nalezena patogenní mutace v genech BRCA1 a BRCA2 v rámci standardního mutačního screeningu. Celkem bylo do konce roku 2006 analyzováno 350 vysoce rizikových pacientů na přítomnost intragenového přeskupení v BRCA1 genu a 180 na přítomnost intragenového přeskupení v BRCA2 genu.

Pro detekci intragenových přestaveb genu BRCA1 a BRCA2 byla použita metoda MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (Schouten et al., 2002). Pozitivní záchyt je ověřován jinou, nezávislou metodou (nejčastěji Long-range PCR) a sekvenováním jsou charakterizovány body zlomu na úrovni genomové DNA.

Přítomnost delece exonu 9 a 10 v CHEK2 genu byla do konce roku 2006 vyšetřena u 392 rizikových jedinců PCR testem a 180 jedinců metodou MLPA.

Výsledky

Intragenová přeskupení v BRCA1 genu

Celkem u 16 rizikových rodin byla zachycena velká delece v BRCA1 genu. MLPA analýza BRCA1 genu odhalila 8 různých delecí pokrývajících 1,9-39 kb BRCA1 genomové DNA. Průměrný věk nástupu nemoci u probandů s detekovanou delecí v genu BRCA1 se pohyboval kolem 40 let a v některých rodinách bylo možné pozorovat efekt snižujícího se věku v době diagnózy onemocnění u mladších generací. Body zlomu byly charakterizovány na úrovni genomové DNA u 5 různých delecí: delece exonů 5-14; exonů 11-12; exonů 18-19, exonu 20 a exonů 21-22. Všechny body zlomu byly nově charakterizovány a nebyly zatím popsány v jiné populaci.

Rozsáhlá BRCA1 delece 39 kb zahrnující oblasti pseudogenu, promotorovou oblast BRCA1 genu a exony 1A/1B-2 byla prokázána pomocí primerů publikovaných pro již dříve charakterizovanou delecí ve francouzské populaci (Puget et al., 2002). Tato delece vzniká rekombinací mezi pseudogenem ψ BRCA1 a odpovídajícími homologními oblastmi intronu 2 genu BRCA1.

Koncem roku 2006 byla nově zachycena delece exonu 8 a delece exonů 1-17 v BRCA1 genu, kde v současné době probíhá potvrzení a charakterizace bodů zlomu.

Zvýšená náchylnost k rozsáhlým intragenovým rekombinacím je v případě genu BRCA1 způsobena zejména vysokou četností *Alu*-repetitivních sekvencí v jeho intronických oblastech (Smith et al., 1996) a také přítomností duplikace oblasti na 5 konci BRCA1 genu obsahující ψ BRCA1 pseudogen (Puget et al., 2002).

Intragenová přeskupení v genu BRCA2

V genu BRCA2 zatím nebylo u českých pacientů detekováno žádné intragenové přeskupení.

Delece exonu 9 a 10 v genu CHEK2

Do konce roku 2006 byly zachyceny 4 vysoce rizikové rodiny s delecí exonu 9 a 10 v genu CHEK2. Delece byly prokázány oběma metodami: MLPA a specifickou PCR.

Závěr

Podíl intragenových delecí v BRCA1 genu nalezených u nejrizikovější skupiny pacientů není rozhodně zanedbatelný. Proto bylo zahájeno testování všech pacientů splňujících kritéria pro testování BRCA genů. V případě všech charakterizovaných delecí

GENOMIKA A PROTEOMIKA

cí v BRCA1 genu byl zaveden jednoduchý screeningový PCR test pro detekci místa zlomu umožňující rychlé, specifické a finančně nenákladné testování příbuzných postižených pacientů.

Delece exonu 9 a 10 v genu CHEK2 se v České populaci jeví jako frekvenčně četnější (4-násobně v naší analyzované skupině) než dříve popsaná mutace 1100delC. Stanovení výše odhadu rizika pro vznik nádoru prsu u nosičů delece exonu 9,10 genu CHEK2 je předmětem dlouhodobější studie.

Práce byla podporována granty MZČR MZO 00209805 a IGA MZČR NR/8213-3.

Literatura

1. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. J. Hum. Genet. 2003; 72:1117-1130.
2. Breast Cancer Linkage Consortium. J. Natl. Cancer Inst. 1999; 91:1310-1316.
3. Cybulski C, Gorski B, Huzarski B, et al. Am J Hum Genet 2004; 75:1131-1135.
4. Easton DF, Bishop DT, Breast Cancer Linkage Consortium. Am. J. Hum. Genet. 1995; 56:265-271.
5. Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Am. J. Hum. Genet. 1998 62:676-689.
6. Offit K, Pierce H, Kirchhoff T, et al. BMC Med Genet. 2003; 4: 1.
7. Puget N, Gad S, Perrin-Vidoz L, et al. Am J Hum Genet 2002, 70: 858 – 865.
8. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Nucleic Acids Res 2002, 30: e57.
9. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, et al. Genome Res 1996, 6: 1029 – 1049.
10. Thompson D, Easton D; Breast Cancer Linkage Consortium. Am. J. Hum. Genet. 2001; 68:410-419.
11. Walsh T, Casadei S, Coats KH, et al. JAMA. 2006; 295:p.1379-88.