

Dědičný syndrom nádoru prsu a/nebo ovaria

Molekulární analýza BRCA1 a BRCA2 genů.

Foretová L., Macháčková E.

Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, Masarykův onkologický ústav, Brno

foretova@mou.cz

Prohlášení: toto doporučení vychází z překladu doporučení EMQN (European Molecular Genetics Quality Network) s úpravou podle konsensu z roku 2003 (Bartoňková et al. Klinická onkologie 1/2003, s. 28-34).

Autoři na sebe neberou zodpovědnost za opomenutí, přesnost nebo případné chyby v tomto doporučení.

Informace k onemocnění

Nádor prsu je v současné době jedno z nejčastěji diagnostikovaných maligních onemocnění u žen. Přibližně každá desátá žena během svého života onemocní nádorem prsu. Přičemž výskyt nádoru prsu u přímé příbuzné výrazně zvyšuje riziko onemocnění. V některých rodinách lze vysledovat výskyt nádoru prsu v několika generacích. Takovéto případy bývají způsobeny genetickou predispozicí, tvoří asi 5-10% z celkového počtu diagnostikovaných, projevují se diagnózou v relativně mladém věku, zvýšeným rizikem bilaterálního nádoru a často přidruženým nádorem vaječníků.

V současné době jsou známy dva hlavní geny BRCA1 a BRCA2, které v mutovaném stavu způsobují predispozici ke vzniku nádoru prsu a ovaria. Mezinárodní souhrnné výsledky vazebné a mutační analýzy u mnohočetně postižených rodin diagnostikovaných s dědičným syndromem karcinomu prsu ukázaly, že až u poloviny rodin byl za onemocnění zodpovědný BRCA1 gen, u další třetiny rodin BRCA2 gen (Ford et al., 1998). Ztrátové mutace v BRCA genech vykazují autozomálně dominantní dědičnost s odhadovaným kumulativním rizikem pro vznik nádoru prsu 84% do věku 70 let (Ford et al., 1998). Kumulativní riziko vzniku karcinomu vaječníků dosahuje 63% pro nosičky BRCA1 mutace a 27% pro nosičky BRCA2 mutace (Easton et al., 1995; Ford et al., 1998).

Mutace BRCA genu způsobuje také zvýšené riziko pro vznik jiných nádorů. Nosiči BRCA1 mutace mají 4-násobně vyšší riziko nádoru tlustého střeva, u mužů je až 3-násobně vyšší riziko vzniku nádoru prostaty vzhledem ve srovnání s ostatní neselektovanou populací (Ford et al., 1998). Nosiči BRCA2 mutace mají přibližně 5-násobné zvýšení rizika pro vznik nádoru žlučníku a žlučových cest; 3,5-násobné zvýšení rizika nádoru pankreatu; 2,5-násobné zvýšení rizika nádoru žaludku a maligního melanomu ve srovnání s ostatní neselektovanou populací (BCLC, 1999).

BRCA1 a BRCA2 gen jsou sekvenčně nepříbuzné proteiny, které se nacházejí společně v multiproteinových komplexech významných pro udržení stability genomu. Jsou součástí komplexů řídících homologní rekombinaci a reparační procesy indukované DNA poškozením, účastní se aktivace transkripce, remodelace chromatinu a regulace buněčného cyklu (Review - Welsch et al., 2000). Jejich poškození způsobuje hromadění mutačních změn v buňce a může vyústit v její maligní zvrhnutí.

BRCA1 gen

Lokalizace: 17q21

OMIM databáze: *113705

Synonyma: breast cancer type 1, BRCA1, breast-ovarian cancer syndrome

Dědičnost: autozomálně dominantní s vysokou penetrancí (>80%)

Lokalizace genu: 1990 (Hall et al., 1990)

Identifikace sekvence genu: 1995 (Miki et al., 1994)
Genbank code: HSU14680 - accession U14680
mRNA: 7,8 kb
Protein: 1863 aa
Kódující sekvence: exon 2-24

Nomenklatura popisu mutací vychází z cDNA

- Human BRCA1, mRNA complete cds, code HSU14680, accession U14680 - Miki et al. (1994)

Mutační databáze: Breast Cancer Information Core Internet Webside
http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/index.html

Stovky různých onemocnění způsobujících mutací byly popsány v celé kódující sekvenci BRCA1 genu až po posledních 10 aminokyselin (Friedman et al., 1994). Významný je také častý výskyt velkých genomických přeskupení BRCA1 genu v některých západních populacích.

BRCA2 gen

Lokalizace: 13q12-13
OMIM databáze: *600185
Synonyma: breast cancer 2, BRCA2, early onset breast cancer syndrome
Dědičnost: autozomálně dominantní s vysokou penetrancí
Lokalizace genu: 1994 (Wooster et al., 1994)
Identifikace sekvence genu: 1995 (Wooster et al., 1995; Tavtigian et al., 1996).
Genbank code: HSU43746 - accession U43746
mRNA: 11-12 kb
protein: 3418 aa
kódující sekvence: exon 2-27

Nomenklatura popisu mutací vychází z cDNA

- Human BRCA2, mRNA complete cds, code HSU43746, accession U43746 – Wooster et al. (1995)

Databáze mutací, sekvenčních variant a jejich klasifikace: Breast Cancer Information Core Internet Webside http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/index.html

Onemocnění způsobující mutace byly u člověka popsány v celé kódující sekvenci genu s výjimkou posledních 93 aminokyselin, které již pravděpodobně nejsou nutné pro funkci BRCA2 proteinu (Mazoyer et al., 1996).

Selekční kritéria a doporučení k vyšetření

Pacientky s velkou pravděpodobností dědičné formy nádorového onemocnění prsu a ovaria by měly být kliniky doporučovány do genetických poraden. Podrobná genetická konzultace by měla předcházet odběru vzorku a podepsání informovaného souhlasu s vyšetřením.

Kritéria, podle kterých by měly být pacientky doporučeny k vyšetření přítomnosti mutace v BRCA genech ([viz Klinická onkologie 1/2003](#)):

Familiární formy:

1. alespoň 3 příímí příbuzní diagnostikováni s karcinomem prsu a/nebo ovaria;

2. 2 příbuzní prvního stupně (nebo druhého stupně paternálně), z nichž alespoň jeden nádor prsu byl diagnostikován pod 50 let věku; při výskytu C56 alespoň u jednoho z příbuzných bez věkového omezení

Sporadické formy

3. pacientka s bilaterálním nádorem prsu a/nebo ovaria s první diagnózou pod 50 let věku nebo pacientka s nádorem prsu a ovaria v jakémkoliv věku
4. sporadický výskyt unilaterálního ca prsu nebo ovaria ve věku pod 35 let
5. muž s nádorem prsu
6. medulární a atyp. medulární C50 (dle rozhodnutí laboratoře)
7. ER-, PR-, ErbB2-, C50 (dle rozhodnutí laboratoře)

Tato kritéria k testování však vytvářejí vyšetřující laboratoře dle svých možností a mohou být předmětem úprav.

Strategie vyšetření

- Kompletní mutační analýza by měla být provedena u postiženého jedince, pokud možno s nejčasnějším výskytem onemocnění.
- Kompletní mutační analýza může být provedena i u zdravého jedince s vysokou pravděpodobností dědičné formy nádoru prsu/ovarí, pokud nežije nikdo z pacientů v rodině
- Detekovaná onemocnění způsobující mutace u postiženého jedince by měla být následně potvrzena z nového vzorku DNA.
- Prediktivní test lze doporučit u příbuzných v riziku starších 18 let v rodinách s detekovanou konkrétní mutací.
- V případech, kdy je riziková rodinná anamnéza ze stran obou rodičů, je vhodné mutační analýzu provést ve všech úsecích obou genů, i pokud je nalezena jedna patogenní mutace

Laboratorní praxe

- Podle EMQN je obecně doporučovaným materiálem pro mutační analýzu BRCA genů genomická DNA izolovaná z periferní krve. Vyšetření mRNA je možné, nicméně EMQN upozorňuje, že mRNA (cDNA) je méně vhodným výchozím materiálem pro analýzu velkých genů jako jsou BRCA geny pro větší technické obtíže a preferenční degradaci mRNA mutované alely nesoucí ztrátovou mutaci tzv. „nonsense mediated decay“.
- Vzhledem k široké škále detekovaných mutací v BRCA genech je vhodné provést kompletní analýzu kódující sekvence (včetně míst sestřihu) obou genů.
- Každá detekovaná mutace, včetně již známých mutací u prediktivních testů, musí být určena na závěr sekvenováním.
- Každá detekovaná mutace musí být ověřena na DNA izolované z nově odebraného vzorku krve nebo nenádorové tkáně pacienta
- Dokud není mutace ověřena z druhého vzorku DNA, nelze nabízet prediktivní testování příbuzným pacienta.
- V závěrečné zprávě z laboratoře musí být uveden genotyp v kontextu klinických informací, tj. řádné vysvětlení významu mutace.
- Mutační analýza by měla zohledňovat místní poznatky o spektru genových alterací a měla by zavádět nové a efektivní metodické přístupy

Screeningové metody, které lze použít pro mutační analýzu (dle EMQN):

- DS - direct sequencing
- DHPLC- denaturing high performance liquid chromatography
- PTT - protein truncation test

- SSCA (SSCP) - single strand conformation analysis
- HA (HD, HDX) - heteroduplex analýza
- HRM - High Resolution Melting analysis
- CSGE - conformation sensitive gel electrophoresis
- DGGE - denaturing gradient gel electrophoresis
- CCM - chemical cleavage of mismatch
- RCA - Rnase cleavage assay
- a metody založené na podobném principu, přičemž u každé metody je nutné brát v úvahu její senzitivitu a limitace.

Doporučené metody pro detekci velkých intragenových přeskupení BRCA1 genu

Southern blot analýza nebo kvantitativní metody stanovující tzv. „dávku genu“ jako je MLPA (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification). Zde je nutné ověření výsledků výše zmíněných analýz jinou nezávislou metodou nebo na mRNA (cDNA) úrovni.

Doporučené metody pro detekci konkrétní mutace

- DS - direct sequencing
- ASO hybridizaci
- Restrikční analýza (pozitivní výsledek musí být ověřen sekvenováním)
- DHPLC nebo HRM (pozitivní výsledek musí být ověřen sekvenováním)
- CHIP - technologie
- a podobně založené metody.

Interpretace výsledků a závěrečné zprávy

Laboratorní zpráva by měla obsahovat popis rozsahu molekulárně genetické analýzy, použité metody včetně jejich limitace. Zpráva z molekulárně genetické laboratoře musí popsat patogenitu nalezené mutace, klinický význam ve formě odhadovaných rizik nádorů, doporučení pro možné prediktivní testování u příbuzných.

Jako patogenní, onemocnění způsobující, mohou být označeny mutace, které mají prokazatelný vliv na funkci proteinu:

- mutace které znemožňují správnou syntézu proteinu („nonsense“ mutace a mutace způsobující posun čtecího rámce) – případně odstraňující významnou funkční doménu proteinu
- mutace vedoucí k aberantnímu sestřihu mRNA (sestřihové mutace) – musí být prokázáno na mRNA úrovni
- jiné mutace, u kterých bylo experimentálně prokázáno poškození funkce proteinu
- sekvenční varianty u kterých byla nezvratně prokázána kosegregace s onemocněním u několika nepříbuzných rodin a které nebyly detekovány ve velké skupině kontrolních vzorků

Sekvenční varianty, které nesplňují některou z výše uvedených podmínek, musí být posuzovány jako neklasifikovatelné.

Podrobné zprávy o výsledku jsou z laboratoře zaslány specialistovi (nejlépe klinickému genetikovi), který doporučil molekulárně genetické vyšetření. Tento lékař by měl být řádně proškolen v oblasti nádorové genetiky. Klinický genetik by měl na základě laboratorní zprávy sepsat podrobnou klinicko-genetickou zprávu. Zpráva musí obsahovat popis rodinné anamnézy, provedená vyšetření, výsledky testování, objasnění významu výsledků, vysvětlení rizik onemocnění a prevence. Zprávu předá tento lékař osobně vyšetřované osobě s náležitým

vysvětlením a doporučením dalšího postupu. Výsledek je privátní záležitostí a nelze o něm informovat třetí osobu bez písemného souhlasu vyšetřované osoby.

Pozitivní výsledek u postiženého jedince z vysoce rizikové rodiny

V případě, že byla zachycena prokazatelně patogenní mutace u postiženého jedince, musí zpráva obsahovat informaci, že nález odpovídá postižení pacienta, a že ostatní příbuzní postiženého pacienta jsou v riziku nádorového onemocnění. Se souhlasem vyšetřované osoby lze nabídnout prediktivní test dospělým příbuzným v riziku.

Negativní výsledek u postiženého jedince z vysoce rizikové rodiny

Riziko, že v rodině segreguje patogenní mutace, stále trvá i v případě, že nebyla během molekulárně genetického vyšetření zachycena patogenní mutace v BRCA genech. Prediktivní test nelze příbuzným v riziku nabídnout.

Prediktivní vyšetření

Testování nezletilých na žádost rodiče nebo třetí strany je nepřípustné.

Svobodnému rozhodnutí dospělého žadatele o prediktivní test musí předcházet komplexní informace (genetické poradenství) a musí mu být poskytnut dostatečný čas na zvážení všech dopadů.

Doporučujeme provést screeninkové vyšetření konkrétního úseku genu ze dvou vzorků DNA z nezávisle odebrané krve vyšetřované osoby; přičemž konečný výsledek by měl být potvrzen sekvenováním alespoň 1 vzorku

Negativní výsledek u prediktivního testu

Výše rizika nádorového onemocnění vyšetřované osoby je stejné jako u běžné populace.

Pozitivní prediktivní test

Vyšetřovaná osoba je nosič patogenní mutace a může v budoucnu onemocnět nádorovým onemocněním s určitou pravděpodobností. Této osobě by měl lékař předávající zprávu podat informace o možnostech

- primárních a sekundární preventivní opatření
- konkrétního programu preventivního sledování
- kontakty na informované odborníky

Kontrola kvality

Vzhledem k tomu, že se díky genetickému testování dostává do rukou pacientů důležitá informace s klinickými konsekvencemi, je vhodné, aby laboratoře poskytující testování pro klinické účely:

- Procházely každoročně mezinárodní kontrolou kvality a výsledek zveřejnily na svých internetových stránkách
- Prošly akreditačním procesem
- Měly zajištěny smlouvy s pojišťovnami

Reference:

Bartoňková et al. (2003) Doporučené zásady péče o nemocné s nádory prsu a vaječníků a zdravé osoby se zárodečnými mutacemi genů BRCA1 nebo BRCA2. Klinická onkologie 16 (1): 28-34

Breast Cancer Information Core Internet Webside (BIC database).

http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/index.html

Breast Cancer Linkage Consortium (1999) Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. J Natl Cancer Inst. 91(15):1310-1316.

Easton DF et al. (1995) Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Am. J. Hum. Genet. 56:265-271.

EMQN (2001) Guidelines for hereditary breast and ovarian cancer. <http://www.emqn.org>

Ford D et al. (1994) Risk of cancer in BRCA1 mutation carriers. Lancet 343:692-695.

Ford D et al. (1998) Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. Am. J. Hum. Genet. 62:676-689.

Friedman LS et al. (1994) Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. Nat Genet 8:399-404.

Hall JM et al. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 250:1684-89.

Mazoyer S et al. (1996) A polymorphic stop codon in BRCA2. Nat Genet 14:253-254.

Miki Y et al. (1994) A strong candidate for the Breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 266:66-71.

Smith TM et al. (1996) Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. Genome Res. 6:1029-1049.

Tavtigian S et al. (1996) The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. Nature Genet 12:333-337.

Welch PL et al. (2000) Insights into functions of BRCA1 and BRCA2. Trends in Genetics 16:69-74.

Wooster R et al. (1994) Localisation of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Science 265:2088-90.

Wooster R et al. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 378:789-792.