

Retrospektivní NGS studie u vysoce rizikových pacientů s hereditární predispozicí k nádorovému onemocnění v Masarykově onkologickém ústavu

Retrospective NGS Study in High-risk Hereditary Cancer Patients at Masaryk Memorial Cancer Institute

Macháčková E., Házová J., Štáhllová Hrabincová E., Vašíčková P., Navrátilová M., Svoboda M., Foretová L.

Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: V současné době bylo popsáno již více než 200 nádorových syndromů. Ve většině populací jsou však dostupné pouze informace o mutačním spektru ve vysoce rizikových genech limitované počtem vyšetřených jedinců. **Metody:** V rámci retrospektivní NGS studie v Masarykově onkologickém ústavu bylo provedeno vyšetření TruSight Cancer panelem zahrnujícím 94 genů u 50 vysoce rizikových jedinců se závažnou osobní i rodinnou anamnézou onkologického onemocnění bez detekované kauzální mutace v genech *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *TP53* nebo *APC* dle indikace. Všechny patogenní nebo pravděpodobně patogenní mutace detekované pomocí NGS technologie byly potvrzeny Sangerovým sekvenováním. **Výsledky:** Ztrátové (frame-shift, nonsense) mutace byly detekovány v genech *ATM*, *BAP1*, *FANCC*, *FANCI*, *PMS2*, *SBDS*, *ERCC2*, *RECQL4*. Několik patogenních nebo pravděpodobně patogenních mutací (missense, predikované sestřihové mutace, in-frame delece/inzerce) bylo zachyceno v genech *ATM*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *ERCC2*, *ERCC3*, *ERCC4*, *FANCA*, *MC1R*, *MEN1*, *MRE11A*, *MUTYH*, *PALB2*, *RAD51C*, *RET*, *SDHB*, *STK11*. Nacházejí se ve vysoce konzervovaných funkčních doménách proteinů a některé z nich již byly prokázány jako patogenní mutace pomocí funkčních testů nebo u závažných autozomálně recesivních syndromů (Ataxia telangiectasia, Fanconiho anémie). Většina z detekovaných missense variant v řadě dalších genů je nejasného klinického významu a determinace jejich významnosti zůstává otevřená do budoucna. **Závěr:** Detekce variant se střední nebo nízkou penetrancí má pouze limitovanou klinickou využitelnost. Panelové testování u vysoce rizikových osob s nádorovým onemocněním může poskytnout důležitou informaci o příčině nádorové predispozice a může pomoci s výběrem optimální léčby a v preventivní personalizované onkologii.

Klíčová slova

hereditární nádorové syndromy – hereditární nádor prsu a ovária – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom – sekvenování nové generace – TruSight cancer panel – MiSeq

Práce byla podpořena MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

This work was supported by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and by the State budget project of CR (OP VaVpl – RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



RNDr. Eva Macháčková, Ph.D.
Oddělení epidemiologie
a genetiky nádorů
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: emachack@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 20. 8. 2015

Přijato/Accepted: 22. 9. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2016535>

Summary

Background: Currently, more than 200 hereditary cancer syndromes have been described, yet, in most countries genetic testing is restricted to a narrow spectrum of genes within a limited group of people tested. **Methods:** For this retrospective study we used the TruSight cancer panel (Illumina) – NGS panel targeting 94 cancer predisposition genes in order to analyze 50 high-risk cancer patients with significant personal and family history of cancer who did not carry mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *TP53* or *APC* genes. All pathogenic and potentially pathogenic mutations detected by NGS technology have been confirmed by Sanger sequencing. **Results:** There were several deleterious (frame-shift/nonsense) mutations detected in *ATM*, *BAP1*, *FANCC*, *FANCI*, *PMS2*, *SBDS*, *ERCC2*, *RECQL4* genes. Various pathogenic or potentially pathogenic (missense, predicted splice site, in-frame insertion/deletion) mutations were detected in *ATM*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *ERCC2*, *ERCC3*, *ERCC4*, *FANCA*, *MC1R*, *MEN1*, *MRE11A*, *MUTYH*, *PALB2*, *RAD51C*, *RET*, *SDHB*, *STK11*. These mutations affect highly conserved protein domains and affect their function as proved by the available functional assays. They were confirmed to be pathogenic as an „Parent No2“ in serious recessive diseases such as Ataxia telangiectasia or Fanconi anemia. The clinical significance of the majority of detected missense variants still remains to be identified. **Conclusion:** Moderate or low penetrance variants are of limited clinical importance. Panel genetic testing in high-risk individuals with cancer provides important information concerning the cause of the investigated cancer, and may assist in the risk assesment and optimal management of the cancer, as well as in further preventive care.

Key words

hereditary cancer syndromes – hereditary breast and ovarian cancer syndrome – hereditary nonpolyposis colorectal cancer – high-throughput DNA sequencing – TruSight cancer panel – MiSeq

Úvod

Během posledních 20 let došlo k výraznému rozvoji v oblasti vyšetření genetické predispozice k nádorovým onemocněním. Na základě genetických vyšetření byla do klinické praxe zavedena léčebná a preventivní doporučení (guidelines) vedoucí ke snížení rizika a časnému zachytu onkologického onemocnění u osob s výraznou genetickou predispozicí s detekovanou mutací ve vysoce penetrantním genu: např. Li-Fraumeni syndrom (mutace v genu *TP53*), Lynchův syndrom (mutace v některém z „mismatch“ reparačních genů – *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* – u dědičného nepolypózního kolorektálního karcinomu), dědičná forma nádoru prsu a ovaria (mutace v genech *BRCA1*, *BRCA2*).

V současné době již bylo popsáno více než 200 různých nádorových syndromů (OMIM databáze), ale molekulárně genetické vyšetření bylo do současné doby dostupné pouze pro nejnámější vysoce rizikové geny.

Pokroky v sekvenační technologii – tzv. sekvenování nové generace (next-generation sequencing – NGS) – umožnily masivní testování sekvence desítek až stovek genů současně, což umožňuje testování známých i potenciálně rizikových genů, které jsou součástí signálních a reparačních drah významných pro nádorovou predispozici. Výrazné rozšíření spektra analyzovaných genů vede nejen k identifikaci kauzálních mutací ve vysoce rizikových genech, ale také k de-

tekci celé řady mutací s dosud nedeterminovanou mírou rizika nebo k detekci středně rizikových variant, které ovšem mohou ve vzájemných kombinacích výrazně navyšovat relativní riziko nádorové predispozice v postižených rodinách.

V současné době jsou nabízeny k vyšetření různé multigenové komerční panely cílené na predikci rizika ke vzniku nádorového onemocnění. K těm rozsáhlejším patří TruSight Cancer Target Genes panel (Illumina), který je jedním z nejčastěji používaných komerčních panelů v laboratořích západní Evropy. TruSight Cancer panel byl vyvinut ve spolupráci Illuminy s týmem profesorky Nazneen Rahman (Institute of Cancer Research ICR, London) v roce 2012 (http://www.illumina.com/products/trusight_cancer.html). Panel je cílen na sekvence 94 genů a 284 SNPs (single nucleotide polymorphisms), které byly v předchozích letech asociovány s hereditární predispozicí k nádorovému onemocnění.

Součástí TruSight Cancer panelu (http://www.illumina.com/products/trusight_cancer.html) jsou proby pro analýzu těchto genů: *AIP*, *ALK*, *APC*, *ATM*, *BAP1*, *BLM*, *BMPR1A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *BUB1B*, *CDC73*, *CDH1*, *CDK4*, *CDKN1C*, *CDKN2A*, *CEBPA*, *CEP57*, *CHEK2*, *CYLD*, *DDB2*, *DICER1*, *DIS3L2*, *EGFR*, *EPCAM*, *ERCC2*, *ERCC3*, *ERCC4*, *ERCC5*, *EXT1*, *EXT2*, *EZH2*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL*, *FANCM*, *FH*, *FLCN*, *GATA2*, *GPC3*, *HNF1A*, *HRAS*, *KIT*, *MAX*, *MEN1*, *MET*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *NF1*, *NF2*, *NSD1*, *PALB2*, *PHOX2B*, *PMS1*, *PMS2*, *PRF1*,

PRKAR1A, *PTCH1*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RB1*, *RECQL4*, *RET*, *RHDF2*, *RUNX1*, *SBDS*, *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SLX4*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *STK11*, *SUFU*, *TMEM127*, *TP53*, *TSC1*, *TSC2*, *VHL*, *WRN*, *WT1*, *XPA*, *XPC*.

V naší retrospektivní studii jsme se zaměřili na otestování komerčně dostupného TruSight Cancer panelu a možnost jeho využití pro odhalení příčiny nádorové predispozice u dříve neobjasněných retrospektivních případů.

Soubor pacientů

Pilotní retrospektivní studie byla provedena u 50 vzorků genomové DNA izolované z periferní krve. DNA byla získána od pacientů s vysoce rizikovou osobní a rodinnou anamnézou výskytu onkologického onemocnění s různými druhy onkologických diagnóz, u kterých nebyla nalezena riziková mutace v rutinně analyzovaných vysoce rizikových genech. Většina z těchto vybraných pacientů byla již dříve vyšetřena na přítomnost mutací v genech *BRCA1*, *BRCA2* (hereditární syndrom nádoru prsu a ovaria – 28 pacientů), *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* nebo *APC* (hereditární syndrom nepolypózního nebo polypózního kolorektálního karcinomu – 10 pacientů) nebo *TP53* (Li-Fraumeni syndrom), případně na jiné vzácné, s vysokou pravděpodobností hereditární nádorové syndromy bez odhalené příčiny nádorové predispozice (nádory ledvin, mozkové nádory, maligní melanom atd.).

Všichni pacienti zařazení do retrospektivní studie souhlasili s vyšetřením genů,

které mohou způsobit predispozici k onkologickému onemocnění, podepsali informovaný souhlas s vyšetřením a souhlasili také s anonymním využitím DNA k lékařskému výzkumu.

Metody

Vyšetření bylo provedeno pomocí TruSight Cancer Target Genes panelu. Principem postupu je enzymatická fragmentace (tagmentace) 50 ng genomové DNA → indexování a pool knihovny → enrichment/hybridizační (TruSight Rapid Capture protocol) postup s ≈ 4 000 prób cílených na → 1 700 exonů 94 nádorově predispozičních genů (255 Kb cílových sekvencí). Sekvenační běh připravené knihovny (s MiSeq Reagent kit V2) na MiSeq systému (Illumina) → analýza pomocí MiSeq reporter software → anotace VCF souborů pomocí Illumina VariantStudio (www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_trusight_cancer.pdf).

Výběr patogenních a potenciálně patogenních variant (predikce významnosti dle Align-GVGD, PolyPhen-2, SIFT programů u missense variant; predikce ovlivnění sestřihu dle GeneSplicer, NNSPLICE; BDGP Splice Site Prediction) → kontrola správnosti HGVS nomenklatury (www.hgvs.org) u in/del variant → kontrola a případně převedení nálezu na referenční sekvenci doporučenou v příslušných mezinárodních mutačních databázích (HGMD, LOVD, IARC atd.).

Navolení primerů k analýze sledovaných variant pomocí LightScanner Primer Design Software (Idaho Technology Inc.), optimalizace PCR (polymerase chain reaction) podmínek a PCR amplifikace sledované oblasti. Potvrzení přítomnosti významných (patogenních a potenciálně patogenních vhodných k segregační analýze) nálezů pomocí Sangerova sekvenování na 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) a jeho ověření u nezávisle izolovaného vzorku DNA.

Segregační analýza u rodin zatížených patogenní nebo potenciálně patogenní variantou.

V případě potvrzování nálezů u genů s přítomností pseudogenů byla provedena dvoukolová „nested“ PCR vycházející z publikovaných primerů, kde autoři deklarovali amplifikaci specifických produktů bez přítomnosti pseudogenů. Pro analýzu genu *PMS2* byly použity primery pro Long-Range PCR (s použitím Expand Long Template PCR system, Roche) a vnitřní primery dle Vaughna et al [1]. Pro analýzu exonu 2. genu *SBDS* byly použity vnější primery dle Kawakamiho et al [2] a vnitřní primery byly navoleny softwarem LightScanner Primer Design (Idaho Technology Inc.).

Výsledky a vybrané kazuistiky

Téměř u poloviny z vyšetřených vzorků DNA byly detekovány patogenní nebo možné/pravděpodobně patogenní (IARC klasifikace UV-4: „likely pathogenic“) mutace v některém z 94 analyzovaných genů.

Ve skupině 28 pacientů s podezřením na dědičnou predispozici nádoru prsu a/nebo ovaria (dříve indikováni k analýze v genech *BRCA1*, *BRCA2* nebo v některých případech také k analýze genu *TP53* bez detekované kauzální mutace) byly nejčastěji detekovány mutace v dráhách reparace dvouřetězcových zlomů (geny *ATM*, *CHEK2*) a ICL (interstrand cross-links) reparace křížových vazeb v DNA (Fanconi anemia geny – *FANCA* geny) spřažené s homologní rekombinací (geny *BRIP1*, *RAD51C*, *PALB2*). Další dráhou s opakovanými záchyty pravděpodobně významných nálezů byla dráha nukleotidové excizní reparace (NER – geny *ERCC2*, *ERCC3*) a geny z rodiny RecQ helikáz (*RECQL4*, *WRN*), které se účastní DNA reparačních procesů. Souhrnné výsledky nálezů u skupiny s podezřením na dědičnou predispozici nádoru prsu a/nebo ovaria jsou uvedeny v tab. 1. Ztrátové (nonsense, frame-shift) mutace byly u této skupiny vyšetřených detekovány v genech: *ATM*, *FANCI*, *FANCC*, *RECQL4* a *SBDS*.

Patogenní missense mutace byly detekovány v genech *FANCA*, *BRIP1* a dále bylo zachyceno několik středně rizikových (≈ 2násobné zvýšení rizika) missense mutací v *CHEK2* genu a *MC1R* receptoru.

Nově detekovaným nálezem je missense mutace v genu *BRIP1* (synonymum *FANCI*, *BACH1*) p.Cys350Tyr u ženy s karcinomem prsu (kazuistika 1). *BRIP1* missense mutace p.Cys350Tyr je

Tab. 1. Nálezy u skupiny vyšetřených s převážně nádory prsu, ovaria, dělohy, štítné žlázy a nádory prostaty (28 vyšetřených jedinců).

Mutovaná dráha	Gen/RefSeq.	Patogenní mutace	Možná riziková (?) varianta: 4-IARC	Interpretace
ATM závislá DNA reparační dráha (dsDNA zlomy)	<i>ATM</i> NM_000051.3	c.1564G>T/ /p.Glu522*		PI3K ztrátová nonsense mutace
ATM závislá DNA reparační dráha (dsDNA zlomy)	<i>ATM</i> NM_000051.3	c.3849delA/ /p.Thr1284Glnfs*9		ztrátová frame-shift mutace
ATM závislá DNA reparační dráha (dsDNA zlomy)	<i>ATM</i> NM_000051.3	c.3848T>C/ /p.Leu1283Pro		mutace popsána jako kauzální (jedna ze dvou rodičovských alel) u dítěte s Ataxia telangiectasia
ATM/CHEK2 reparační dráha	<i>CHEK2</i> NM_007194.3	c.470T>C/ /p.Ile157Thr		středně riziková alela (3krát detekováno)
ATM/CHEK2 reparační dráha	<i>CHEK2</i> NM_007194.3		c.176C>A/ /p.Thr59Lys	vysoce konzervovaná SQ/TQ doména (PolyPhen2: 0,999; Align-GVGD: C65)

Tab. 1 – pokračování. Nález u skupiny vyšetřených s převážně nádory prsu, ovaria, dělohy, štítné žlázy a nádory prostaty (28 vyšetřených jedinců).

Mutovaná dráha	Gen/RefSeq.	Patogenní mutace	Možná riziková (?) varianta: 4-IARC	Interpretace
Fanconiho anémie: reparace křížových vazeb	FANCA NM_000135.2	c.1549C>T/ /p.Arg517Trp		mutace popsána jako kauzální (jedna ze dvou rodičovských alel) u ženy s pozdním projevem Fanconiho anémie a nádorem prsu [9]
Fanconiho anémie: reparace křížových vazeb	FANCA NM_000135.2		c.2939C>T/ /p.Ala980Val	nereportovaná, vysoce konzervovaná AA predikce patogenní (PolyPhen2: 1,00; Align-GVGD: C65)
Fanconiho anémie: reparace křížových vazeb	FANCA NM_000135.2		c.1874G>C/ /p.Cys625Ser	vysoce konzervovaná AA predikce patogenní (PolyPhen2: 0,99; Align-GVGD: C65) (2krát detekováno)
Fanconiho anémie: reparace křížových vazeb	FANCA NM_000135.2		c.3263C>T/ /p.Ser1088Phe	vysoce konzervovaná AA, predikce patogenní (PolyPhen2: 0,93; Align-GVGD: C65) – reportována konfliktní data – (6krát detekována)
Fanconiho anémie: reparace křížových vazeb	FANCI NM_001113378.1	c.3853C>T/ /p.Arg1285*		ztrátová mutace
Fanconiho anémie: reparace křížových vazeb	FANCC NM_001243743.1	c.455dupA/ /p.Asn152Lysfs*9		ztrátová mutace (OA: triplicita: nádor prsu, CRC nádor, melanom)
DNA reparace: dsDNA zlomy, reparace křížových vazeb, homologní rekombinace	BRIP1 NM_032043.2	c.1049G>A/ /p.Cys350Tyr		vysoce konzervovaná doména, jeden z vazebných cysteinů Fe-S domény; patogenní mutace [3]
DNA reparace: dsDNA zlomy, reparace křížových vazeb, homologní rekombinace	PALB2 NM_024675.3		c.2993G>A/ /p.Gly998Glu	konzervovaná AA, predikce patogenní (PolyPhen-2: 1,0; Align-GVGD: C0) – reportována konfliktní data (2krát detekováno)
DNA reparace: homologní rekombinace	RAD51C NM_058216.1		c.859A>G/ /c.Thr287Ala	popsán defekt DNA reparace [5] – reportována konfliktní data
DNA reparace: homologní rekombinace	RAD51C NM_058216.1		c.335G>C/ /p.Gly112Ala	vysoce konzervovaná doména, predikce patogenní (PolyPhen2: 1,00; Align-GVGD: C55)
NER – nukleotidová excizní reparace	ERCC2 NM_000400.3	c.1703_1704delTT/ /p.Phe568Tyrfs*2		ztrátová mutace (2krát detekováno)
NER – nukleotidová excizní reparace	ERCC3 NM_000122.1		c.2087T>G/ /p.Met696Arg	vysoce konzervovaná doména, predikce: Align-GVGD: C65; PolyPhen2: 0,157
sukcinát dehydrogenázový komplex	SDHB NM_003000.2		c.487T>C/ /p.Ser163Pro	záměna popsána jako příčina „Cowden like“ syndromu [23] – reportována konfliktní data
RNA metabolismus	SBDS	c.184A>T/ /p.Lys62*		ztrátová nonsense mutace
melanocortin-1 receptor	MC1R NM_002386.3	c.451C>T/ /p.Arg151Cys		středně riziková alela (4krát detekováno)
RecQ helikáza (DNA reparace, rekombinace)	RECQL4 NM_004260.3	c.3008_3009delITG/ /p.Val1003Alafs*29		ztrátová mutace
RecQ helikáza (DNA reparace, rekombinace)	RECQL4 NM_004260.3		c.212A>G/ /p.Glu71Gly	predikován aberantní sestřih (-55 % pro nativní místo sestřihu)
RecQ helikáza (DNA reparace, rekombinace)	WRN NM_000553.4		c.2059T>G/ /p.Leu687Val	predikován vznik kryptického místa sestřihu
RecQ helikáza (DNA reparace, rekombinace)	WRN NM_000553.4		c.2273G>A/ /p.Ser758Asn	predikován aberantní sestřih (-20 % pro nativní místo sestřihu)

AA – aminokyselina

lokalizována v jednom ze čtyř vazebných cysteinů Fe-S domény a je naprosto ztrátová pro helikázovou funkci *BRIP1* [3]. *BRIP1* helikáza interaguje s komplexem *BRCA1/BRCA2/RAD51/PALB2* a je nezbytná pro reparaci dsDNA zlomů a homologní rekombinaci. *BRIP1* mutace p.Cys350Tyr zatím nebyla popsána germinálně, ale ztrátové mutace v genu *BRIP1* jsou asociovány s predispozicí k nádorům prsu [4].

U některých jedinců bylo nalezeno několik patogenních a potenciálně patogenních variant, zatímco u jiných byly přítomny pouze běžné (nízkorizikové) nálezy.

U pacientky (ročník 1977) s nádorem ovaria ve 29 letech a pozdější diagnózou nádoru štítné žlázy byla detekována ztrátová mutace v genu *ATM* c.3849delA, přičemž nádory vaječníků nepatří do typického spektra nádorů u ztrátových *ATM* mutací. U této pacientky však byla zároveň zachycena missense mutace v genu *RAD51C* p.Thr287Ala, která byla popsána jako riziková mutace na základě funkčního testu [5,6]. *RAD51C* je protein funkční v procesech homologní rekombinace a DNA reparace spřažené s homologní rekombinací. Patogenní mutace v genu *RAD51C/FANCO* jsou popisovány především v souvislosti s HBOC fenotypem v postižených rodinách a v případě homozygotní nebo bialelické mutace s projevy recesivního syndromu Fanconio anémie (FA) [7]. A právě mutace v genu *RAD51C* jsou častěji přítomny u ovariálních nádorů a mohlo by se v tomto případě jednat o významný modifikační faktor. Analýza probandek s karcinomem ovaria z HOC a HBOC rodin v ČR prokázala přítomnost patogenních mutací v genech *RAD51C* a *RAD51D* u 3 % vyšetřovaných [8].

Jiným příkladem vícečetných nálezů je žena (ročník 1970) s nádorem prsu v 32 letech s missense mutací ve vysoce konzervované doméně genu *ATM* p.Leu1283Pro, která byla již dříve zachycena jako jedna z rodičovských alel u dítěte s recesivním syndromem Ataxia Telangiectasia (Ataxia-Telangiectasia databáze). Jako další riziková mutace byla u této ženy missense mutace v genu *FANCA* p.Arg517Trp, která se opět nachází ve vysoce konzervované doméně a byla zachycena germinálně jako druhá

Kazuistika 1. Kazuistika pacientky s *BRIP1* mutací.

Osobní anamnéza: Pacientka MP nar. 1961, zemřela 2007. Ve 44 letech byla dg. karcinomem prsu l. sin, inv. ductální G3, vysoká proliferace, triple negativní, T1, SNB pozitivní, M0. Parciální mastektomie. Po roce recidiva tumoru v oblasti nadklíčku, krku i prsu. CHT bez efektu. Karcinomatóza mening.

Rodinná anamnéza: Matka a její rodina bez onkol. onemocnění. Otec zemřel na IM, sestra otce zemřela v 55 letech na nádor prsu, matka otce zemřela v 63 letech na nádor malé pánve, otec otce zemřel v 70 letech na karcinom slinivky, nekuřák.

Sestra JH nar. 1962, v době testování v roce 2007 zdravá, v roce 2014 v 51 letech karcinom prsu l. sin, invazivní NST s apokrinální diferenciací, střední proliferativní aktivita, triple negativní, T2 N1 M0. Její syn zemřel na neuroblastom ve dvou letech.

Historie genetického testování v rodině: Testování *BRCA1/2* genů v roce 2007 u pacientky MP – negativní; v roce 2014 testování u sestry JH na *TP53* a *CHEK2* – negativní. JH zařazena do testování pomocí TruSight Cancer Panel (Illumina): výsledky testování NGS u pacientky JH: *BRIP1*/c.1049G>A/p.Cys350Tyr, patogenní mutace. Záměna se nachází ve vysoce konzervované Fe-S doméně *BRIP1* proteinu, která je nezbytná pro helikázovou funkci proteinu.

Segregační analýza: Další testování v rodině: mutace segreguje s onemocněním v rodině, *BRIP1* přenašečka je i sestra PM s ca prsu v 44 letech, mutaci zdědily od svého otce (matka mutaci nenese), jehož sestra zemřela na ca prsu v 55 letech a jehož matka zemřela na nádor malé pánve v 63 letech.

Zhodnocení: *BRIP1(BACH1/FANC-J)* mutace je velmi pravděpodobně příčinou dědičné dispozice k nádorům prsu v rodině. Není jasné, zda mutace v genu *BRIP1* mohla souviset s onemocněním neuroblastomem u syna JH.

Odhad rizika: Gen *BRIP1* je genem středně zvýšeného rizika nádorů prsu (2–5krát), je uváděno vysoké riziko nádorů vaječníků (až 8krát), možné je i riziko jiných nádorů.

Doporučení: Nejsou známa preventivní doporučení u nosičství mutace v genu *BRIP1*. Prediktivní testování v rodině je vhodné.

Kazuistika 2. Kazuistika pacientky s *FANCI* mutací.

Osobní anamnéza: Pacientka BM, nar. 1992, v 17 letech 2009 trombóza PDK, plicní embolie, byla v té době nemocná, ležela, užívala HAK. Zjištěna Leidenská mutace, heterozygot. Warfarin asi rok. Náhlé bolesti břicha, zvracení, zhubla asi 2 kg, UZ. Zjištěn nádor hlavy pankreatu. Operace ve FN Brno 3/14, resekce hlavy pankreatu, histologicky pseudopapilární neoplazie, prekanceróza. Bez další léčby. Dříve potíže se slinivkou a trávením neměla. Vyšetření na endokrinologii, UZ štítnice a příštítných tělísek bpn, CT břicha, nadledviny v pořádku. Prolaps mitrální chlopně zjištěn ve 13 letech, jen sledování.

Rodinná anamnéza: Matka zdravá, její rodina bez onkol. onemocnění. Otec zdravý, matka otce nádor prsu v 47 letech, karcinom slinivky v 67 letech, kuřák, zemřela, její sestra nádor prsu asi mezi 40 a 50 lety. Její bratr nádor prostaty, její otec nádor kolo-rekta v 76 letech. Otec otce nádor plic, kuřák, jeho bratr nádor slinivky, kuřák.

Historie genetického testování v rodině: U probandky testování *BRCA1/2* genů – nalezena missense varianta v genu *BRCA2* c.8851G>A/p.Ala2951Thr, která je klasifikována jako varianta nejasného klinického významu, na základě pravděpodobnostního proteinového modelu pravděpodobně neutrální.

Výsledky testování NGS u probandky: TruSight Cancer panel, Illumina: heterozygotní mutace v genu *FANCI* c.3853C>T/p.Arg1285*, inaktivující patogenní mutace.

Zhodnocení: U probandky **nebyla zjištěna jednoznačná příčina** nádoru slinivky, dědičný nádorový syndrom. Gen *FANCI* je považován za gen mírného rizika nádorových onemocnění. Jeho vztah k nádoru u probandky není jasný. Prediktivní testování je sporné. Preventivní sledování je možné dle rizika rodinné anamnézy.

Tab. 2. Nálezů u skupiny vyšetřených s převážně kolorektálními nádory polypózními i nepolypózními a nádory GIT (10 vyšetřených jedinců).

Mutovaná dráha	Gen/RefSeq.	Patogenní mutace	Možná riziková (?) varianta: 4-IARC	Interpretace
ATM závislá DNA reparační dráha (dsDNA zlomy)	ATM NM_000051.3		c.6067G>A/ /p.Gly2023Arg	nepopsaná, vysoce konzervovaná doména, predikce patogenní (PolyPhen2: 1,0; Align-GVGD: C25)
ATM/CHEK2 reparační dráha	CHEK2 NM_007194.3	c.470T>C/ /p.Ile157Thr		středně riziková alela (2krát detekováno)
BER – bázeová excizní reparační	MUTYH NM_001128425.1	c.536A>G/ /p.Tyr179Cys		častá patogenní mutace evropské populace
Fanconiho anémie: reparační křížových vazeb	FANCA NM_000135.2		c.2151G>T/ /p.Met717Ile	predikován aberantní sestřih (-55,7 % pro nativní místo sestřihu)
Fanconiho anémie: reparační křížových vazeb	FANCA NM_000135.2		c.3263C>T/ /p.Ser1088Phe	vysoce konzervovaná AA, predikce patogenní (PolyPhen2: 0,93; Align-GVGD: C65) – reportována konfliktní data
MEN1 dráha	MEN1 NM_000244.3	c.809_817del/ /p.Trp270_Leu-272del		„in-frame“ delece ve vysoce konzervované doméně, popsána u pacientů s MEN1 syndromem
sukcinát dehydrogenázový komplex	SDHB NM_003000.2		c.487T>C/ /p.Ser163Pro	záměna popsána jako příčina „Cowden like“ syndromu [23] – reportována konfliktní data
DNA reparační: homologní rekombinace	PALB2 NM_024675.3		c.2816T>G/ /p.Leu939Trp	částečně narušuje PALB2-RAD51C-BRCA2 komplex [24] – reportována konfliktní data
DNA reparační: homologní rekombinace	PALB2 NM_024675.3		c.2993G>A/ /p.Gly998Glu	vysoce konzervovaná AA, predikce patogenní (PolyPhen2: 1,0; Align-GVGD: C0) – reportována konfliktní data
„mismatch“ reparační chybného párování bází	MSH6 NM_00179.2		c.2932C>A/ /p.Gln978Lys	nepopsaná, vysoce konzervovaná AA, predikce patogenní (PolyPhen2: 1,0; Align-GVGD: C55)
„mismatch“ reparační chybného párování bází	PMS2 NM_000535.5	c.2T>A/p.Met1?		translační iniciační kodon – ztrátová mutace (dítě s CRC ve 14)
„mismatch“ reparační chybného párování bází	PMS2 NM_000535.5	c.2521delT/ /p.Trp841Glyfs*10		ztrátová mutace ve vysoce konzervované C-terminální doméně (dítě s CRC ve 14)
STK11 (LKB1; serin treonin kináza 11) signální dráha	STK11 NM_000455.4		c.740_743delin-sTCAC/ /p.Asn247_Ile-248delinsIleThr	nepopsaná, 2 missense varianty ve vysoce konzervované katalytické doméně (Align-GVGD: C65/C65; Polyphen2: 0,94/0,624); OA: triplicita: nádor prsu, CRC nádor, melanom
TSC2 signální dráha	TSC2 NM_000548.3		c.1820C>T/ /p.Ala607Val	predikce aktivace kryptického místa sestřihu (?)

AA – aminokyselina

alelická mutace v německé populaci u ženy s relativně pozdními projevy FA (AML po 40. roce věku) a s nádorem prsu ve 37 letech [9].

U pacientky s nádorem slinivky (ročník 1992) s rodinnou anamnézou karcinomu prsu a karcinomu slinivky byla zachycena nonsense mutace v genu

FANCI p.Arg1285* (kazuistika 2). Autozomálně recesivní syndrom FA je způsoben bi-alelickými mutacemi v FA genech. Relativní riziko u heterozygotních nosičů mutace v některém z *FANC* genů je značně variabilní [10]. Mutace v genu *FANCI* jsou celosvětově velmi vzácné, riziko solidních nádorů u heterozygotních

nosičů ve *FANCI* genu není známo (LOVD Fanconi anemia database [11]).

Pacienti s podezřením na HNPCC nebo FAP

Ve skupině 10 pacientů s podezřením na dědičnou predispozici nádoru k nádoru kolorekta bez detekované kauzální mu-

tace v genech *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* (nepolypózní kolorektální karcinom) nebo *APC* (familiární polypózní syndrom) byly detekovány patogenní mutace v reparační dráze bázové excizní reparace BER (gen *MUTYH* způsobující autozomálně recesivní formu polypózy), středně rizikové mutace v genu *CHEK2* a „in-frame“ delece v genu *MEN1* c.809_817del, která již byla popsána u jedinců s *MEN1* syndromem [12] a v naší studii byla zachycena u mladého muže (ročník 1986) s rodinnou anamnézou nádoru kolorekta, gastrinomu a nádoru žaludku. Souhrnné výsledky nálezů u skupiny s podezřením na dědičnou predispozici k nádorům GIT jsou uvedeny v tab. 2. Je zde zařazena také žena (ročník 1946) s triplicitou: duplicitní nádor prsu (52, 62 let) s adenokarcinomem tlustého střeva a maligním melanomem, která byla jako jediná zařazena v obou výše zmíněných skupinách. U pacientky byla detekována frame-shift mutace v genu *FANCC* c.455dupA (tab. 1) spolu s pravděpodobně patogenní in/del mutací v genu *STK11* (synonymum *LKB1*) c.740_743delinsTCAC/p.Asn247_Ile248delinsIleThr nacházející se ve vysoce konzervované katalytické doméně *STK11* kinázy (tab. 2). V tomto případě můžeme spekulovat, že *FANCC* mutace je pravděpodobným rizikovým faktorem predispozice k nádoru prsu a *STK11* mutace ke vzniku adenokarcinomu.

U dítěte (chlapec, ročník 1999) diagnostikovaného s kolorektálním karcinomem ve 14 letech byly detekovány dvě patogenní mutace v genu *PMS2* (kazuistika 3). Inaktivující *PMS2* mutace c.2T>A v iniciačním kodonu pro metio-

Kazuistika 3. Kazuistika pacienta s bialelickou *PMS2* mutací.

Osobní anamnéza: Pacient BD, nar. 1999, byl diagnostikován nádorem sestupného tračníku ve 14 letech, nádor bifokální, adenokarcinom G2, pT2 pN1a M0, stadium IIIA. Provedena levostranná hemikolektomie, přeléčen chemoterapií FOLFOX.

Rodinná anamnéza: Mladší bratr zdravý. Otec zdravý, jeho sestra zdravá. Matka 1980 zdravá, bratr jejího otce zemřel na karcinom v 56 letech, dg. není známá.

Historie testování: Při standardním testování *MLH1*, *MSH2* a *MSH6* zjištěna varianta nejasného významu v *MSH6* genu/c.3217C>T/p.Pro1073Ser. Je klasifikována jako varianta class 3 v databázi InSIGHT.

Výsledky testování NGS u probanda: TruSight Cancer panel, Illumina: zjištěna bialelická mutace v genu *PMS2*: *PMS2*/c.2521delT, frame shift mutace p.Trp841Glyfs*10; a inaktivující *PMS2* mutace c.2T>A v iniciačním kodonu pro methionin: p.Met1?, která je patogenní mutací znemožňující syntézu proteinu.

Zhodnocení: U probanda byl potvrzen dědičný syndrom konstitučního deficitu mismatch opravného systému (CMMR-D), který je způsoben bialelickou mutací v genu *PMS2*. Tento syndrom je spojený s vysokým rizikem hematologických malignit, atypických nádorů mozku a časnými nádory kolorekta. Mohou být kožní příznaky ve formě café-au-lait.

Doporučení: Je nutná úprava dalšího preventivního onkologického sledování u probanda. Dále je nutné prediktivní testování bratra, obou rodičů i vzdálených příbuzných k predikci HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer – dědičná forma nepolypózního karcinomu tlustého střeva).

nin p.Met1? je patogenní mutací znemožňující syntézu proteinu. Druhou detekovanou *PMS2* mutací je c.2521delT, která způsobuje posun čtecího rámce (frame-shift) a předčasnou terminaci translace v C-terminální dimerizační doméně *PMS2* proteinu, která je klíčová pro vazbu s *MLH1* proteinem [13]. Bialelické mutace v *PMS2* genu způsobují závažnou MMR deficienci s manifestací intestinálních nádorů v dětském věku [14].

Pacienti se sarkomy nebo nádory mozku

V tab. 3 je uveden souhrn nálezů u skupiny pěti pacientů s diagnózami sar-

komu nebo nádory mozku bez detekované mutace v genu *TP53*. Bezpochyby významným nálezem je missense mutace v genu *ATM* p.Asn2875Ser, kde Asn2875 je katalytickou aminokyselinou v aktivním místě PI3K domény, a bylo experimentálně prokázáno, že substituce za jinou aminokyselinu (Asn > Lys, Asn > Ser) inaktivuje kinázovou aktivitu *ATM* [15,16]. *ATM* mutace p.Asn2875Ser zatím nebyla germinálně popsána (kazuistika 4).

Pacienti s různými typy nádorů

V tab. 4 jsou uvedeny souhrnné výsledky u osmi pacientů s různými druhy nádorů

Tab. 3. Nálezy u skupiny vyšetřených s převážně sarkomy nebo nádory mozku (5 vyšetřených jedinců).

Mutovaná dráha	Gen/RefSeq.	Patogenní mutace	Možná riziková (?) varianta: 4-IARC	Interpretace
ATM závislá DNA reparační dráha (dsDNA zlomy)	ATM NM_000051.3	c.8624A>G/ /p.Asn2875Ser		PI3K inaktivující mutace [15]
Fanconiho anémie: reparační křížových vazeb	FANCA NM_000135.2		c.3263C>T/ /p.Ser1088Phe	vysoce konzervovaná AA, predikce patogenní (PolyPhen2: 0,93; Align-GVGD: C65) – reportována konfliktní data
cyclin dependentní kinázy 4/6	CDK4 NM_000075.3		c.625C>T p.Arg209Cys	vysoce konzervovaná katalytická doména (PolyPhen2: 0,26; Align-GVGD: C65)

AA – aminokyselina

Kazuistika 4. Kazuistika pacienta s *ATM* mutací.

Osobní anamnéza: Pacient CD, nar. 1975, v 7 letech léčen pro rhabdomyosarkom pánve, operace, CHT a RT ve Francii, recidiva a reoperace s endoprotézou kyčle, ve 31 letech 2006 světlobuněčný karcinom ledviny l. dx, Furman nuclear grade 1, T1 bN0 M0. Nefrektomie radikální l. dx v MOÚ. V roce 2014 v 39 letech světlobuněčný karcinom l. sin, parciální nefrektomie. Dále zjištěny opakovaně polypy tlustého střeva, tubulární adenom, smíšený polyp, opakovaně polypektomie laparoskopicky.

Rodinná anamnéza: Rodina ve Francii: otec Grawitz ve 46 letech, bratr otce nádor ledviny v 46 letech, polymorfni (clear cell tubulopapillary) a leukemie, zemřel v 50 letech, další bratr otce karcinom tlustého střeva v 55 letech, sestra otce karcinom slinivky. Rodiče otce bez onkol. onemocnění.

Historie genetického testování v rodině: Testování u otce a jeho rodiny ve Francii: VHL, Birt-Hogg-Dube syndrom, HNPCC – negativní.

Výsledky testování NGS u probanda: TruSight Cancer panel, Illumina: heterozygotní mutace v genu *ATM* c.8624A>G/p.Asn2875Ser, inaktivující PI3K doménu, patogenní mutace; heterozygotní missense varianta v genu *FANCA* c.3263C>T/p.Ser1088Phe, varianta nejasného významu s predikovaným patogenním efektem.

Segregační analýza: Výsledky testování předány rodině ve Francii.

Zhodnocení: Heterozygotní mutace v genu *ATM* patří mezi středně rizikové, heterozygotní mutace v genu *FANCA* řazeny k alelám nízkého rizika vzhledem k nádorové predispozici. Nelze jednoznačně říci, zda jsou příčinou nádorových onemocnění, je vhodná segregační analýza ve Francii.

Odhad rizika: U heterozygotů *ATM* mutace bylo popsáno vyšší riziko vzniku nádorů prsu u žen 2–3krát, pro ženy do 50 let až 5krát, zvýšené riziko může být i pro jiné typy nádorů. Některé studie popisují možné vyšší riziko nádorů jícnu, kolorekta a žaludku. U žen je uváděno riziko pro jiné typy nádorů asi dvojnásobné, u mužů asi 1,3násobné.

Doporučení: Prevence u příbuzných vhodná dle rodinné anamnézy.

s pravděpodobnou genetickou predispozicí, kteří již byli dříve vyšetřeni na mutace v různých genech (dle diagnózy *TP53*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *FLCN*, *VHL*, *RB1*) bez nálezu kauzální patogenní mutace.

U mladé ženy s rodinnou anamnézou maligního mezoteliomu a uveálního melanomu byla detekována frame-shift mutace v genu *BAP1*: c.217delG (kazuistika 5). Gen *BAP1* kóduje ubikvitin-karboxyterminální hydrolázu, která se nachází v komplexu s *BRCA1* proteinem a účastní se DNA reparačních procesů, regulace transkripce a buněčné proliferace. Mutace v genu *BAP1* byly popsány u autozomálně dominantního nádorového syndromu, který je asociován především s výskytem maligního mezoteliomu a uveálního melanomu [17].

U pacienta s karcinomem ledviny v 51 letech byla detekována patogenní missense mutace v genu *SDHB* p.Arg242His, která se nachází ve vysoce konzervované Fe-S doméně

SDHB proteinu. Jedná se o již dříve popsanou mutaci u pacientů s diagnózou feochromocytomu, paragangliomu a GIT stromálních tumorů (LOVD databáze, [18]).

Při analýze 94 genů je u každého jedince detekováno také velké množství variant nejasného významu (IARC klasifikace UV-3, nejasného významu – neklasifikované [19]) a frekvenčně častých nízkorizikových polymorfni variant. Tyto varianty však mají minimální klinickou využitelnost [20] a v tomto stručném sdělení nebudou rozebírány.

Diskuze

Technologie NGS v současné době přechází z výzkumu do diagnostické praxe. Rutinní klinické využití vyžaduje vysokou senzitivitu, vysokou specifitu, pokud možno jednoduchost přípravy sekvenačních knihoven, cenovou přijatelnost a uživatelsky zvládnutelnou analýzu dat.

Genetické testy by měly být hodnoceny na základě analytické validity, klinické validity a klinické využitelnosti [20].

Analytická validita vyjadřuje stupeň citlivosti a specifity testu, zda správně vyhodnotí přítomnost nebo nepřítomnost mutace (varianty) ve vyšetřovaném genu. Nezbytné je dostatečné pokrytí (min. 50krát v případě germinálních mutací) kódujících oblastí analyzovaných genů včetně sestřihových míst v intro-nech (min. ± 20 bp). S klesajícím pokrytím narůstá množství falešně pozitivních záchytů.

Při detekci patogenní germinální mutace v případě, že tyto výsledky mají být použity ke klinickým účelům, je nezbytný průkaz její přítomnosti Sangerovým sekvenováním a potvrzení z nezávisle izolovaného vzorku DNA (nejlépe z nového odběru). To zahrnuje navolení primerů specifických pro analyzovanou oblast, optimalizaci podmínek amplifikace a sekvenování „klasickou“ Sangerovou metodou. Tyto primery jsou pak dále využity pro segregační analýzu v postižené rodině.

V případě detekce missense variant s „pouze“ predikovaným patogenním efektem jsou zapotřebí další analýzy, jako je segregační analýza, funkční testy zaměřené na funkční domény s přítomností detekované varianty, analýza sestřihu na mRNA úrovni u predikovaných sestřihových mutací.

U GC bohatých oblastí často dochází k chybnému alignmentu (mapování na referenční sekvenci) až k úplnému výpadku analyzovaných sekvencí (V TruSight Cancer panelu je to markantní např. u genů *PHOX2B* nebo *CDKN1C*). Je proto nezbytné kontrolovat nejen detekované varianty, ale je třeba brát v úvahu také nepokryté úseky analyzovaných genů a v případě indikace vyšetření těchto genů, doplnit vyšetření chybějících oblastí alternativní metodou.

Z našich zkušeností jsou NGS technologie méně citlivé na rozsáhlejší delece/duplikace přesahující cca 10 párů bází. Obecně ale nelze definovat pouze rozsah, protože záleží na sekvenci analyzovaného úseku a lokalizaci delece/inzerce vzhledem k pozici oligonukleotidů hybridizujících na cílené sekvence (u enrichment/hybridizačního postupu).

Tab. 4. Nález u skupiny vyšetřených s různými druhy nádorů s pravděpodobnou dědičnou predispozicí (8 vyšetřených jedinců).

Mutovaná dráha	Gen/RefSeq.	Patogenní mutace	Riziková (?) varianta: 4-IARC	Interpretace	Osobní (OA)/rodinná (RA) anamnéza
BRCA1 regulovaná ubiquitin-signalní dráha	BAP1 NM_004656.2	c.217delG/ /p.Asp73 Metfs*5		ztrátová mutace v BAP1 ubiquitin hydroláze	RA: maligní mezoteliom (Dg. 45), uveální melanom (Dg. 22), nádor hlavy (Dg. 40)
E-cadherine dráha	CDH1 NM_004360.3		c.1034T>C/ /p.Val345Ala	nepopsaná, konzervovaná AA predikce patogenní (PolyPhen2: 0,87, Align-GVGD: C65)	OA: enchodrom (Dg. 8), glioblastom (Dg. 28), karcinom jater (Dg. 32)
sukcinat dehydrogenázový komplex	SDHB NM_003000.2	c.725G>A/ /p.Arg 242His		postihuje vysoce konzervovanou Fe-S doménu, patogenní mutace	OA: nádor ledvin (Dg. 51)
NER – nukleotidová excizní reparace	XPC NM_004628.4		c.1780C>T/ /p.Arg594Cys	vysoce konzervovaná AA, predikce patogenní	OA: Ewingův nádor ledvin (Dg. 33)
NER – nukleotidová excizní reparace	ERCC4 NM_005236.2		c.1135C>T/ /p.Pro379Ser	vysoce konzervovaná AA, predikce patogenní (PolyPhen2: 1,0; Align-GVGD: C65)	OA: glioblastom (Dg. 49); RA: CRC (Dg. 50, 58, 82)
„mismatch“ reparace chybného párování bází	MSH6 NM_001179.2		c.1999G>C/ /p.Asp667His	vysoce konzervovaná AA, predikce patogenní (PolyPhen2: 1,0; Align-GVGD: C65)	OA: glioblastom (Dg. 49); RA: CRC (Dg. 50, 58, 82)
cyclin dependentní kinázy 4/6	CDK4 NM_000075.3		c.629G>A/ /p.Arg210Gln	vysoce konzervovaná katalytická doména (PolyPhen2: 0,58; Align-GVGD: C0)	OA: nádor ledvin (Dg. 35)
RET signální dráha	RET NM_020975.4	c.2556C>G/ /p.Ile852Met		ATA – class A mutace [25]	OA: retinoblastom (Dg. 6); RA: nádor ledvin

AA – aminokyselina

Kazuistika 5. Kazuistika pacientky s BAP1 mutací.**Osobní anamnéza:** Pacientka LŠ, nar. 1985, hypertenze léčená od 27 let, hypercholesterolemie. Odstraňována kožní znamínka.**Rodinná anamnéza:** Matka zemřela ve 45 letech na plicní embolii, maligní mezoteliom pleury v 44 letech, nekuřák, bez kontaktu s azbestem. Bratr matky zemřel v 45 letech, maligní mezoteliom peritonea, kuřák. Matka matky melanoblastom oka v 22 letech, její matka zemřela na nádor hlavy asi ve 40 letech.**Historie genetického testování v rodině:** Testování u probandky (nikdo z nemocných nežije) na *TP53* a *CDKN2A* mutace negativní.**Výsledky testování NGS u probandky:** TruSight Cancer panel, Illumina: mutace v genu *BAP1* c.217delG/p.Asp73Metfs*5. Jedná se o vysoce rizikovou mutaci, která je příčinou dědičného nádorového syndromu *BAP1*.**Segregační analýza:** Nikdo z nemocných příbuzných nežije. U tety a sestry bylo provedeno prediktivní testování *BAP1* mutace, výsledek byl negativní.**Zhodnocení:** *BAP1* nádorový syndrom je autozomálně dominantně dědičný syndrom s vysokým rizikem vzniku maligního mezoteliomu, uveálního melanomu, kožního melanomu (včetně MIBAIT – melanocytic BAP1-mutated atypical intradermal tumor), nádorů ledvin, ale i jiných nádorů, jako jsou nádory prsu, vaječníků, prostaty, slinivky, meningeomy.**Dispenzarizace v MOÚ:** UZ prsou po půl roce střídavě s MRI prsou/nebo celotělovým MRI (včetně MRI mozku). Specializované kožní, oční kontroly včetně očního pozadí po půl roce, gynekologické kontroly včetně UZ, od 45 let kolonoskopie po pěti letech. V roce 2014 v rámci dispenzarizace v 29 letech dg. maligní melanom zad, Clark III/Breslow 1, bez ulcerace T1 N0 M0. Klinické stadium IA. Excise mimo MOÚ, reexcise v MOÚ, SNB axily vlevo.**Závěr:** Testování u zdravé příbuzné potvrzen vzácný dědičný nádorový syndrom *BAP1*. Díky dispenzarizaci časně diagnostikována maligní melanom, bez nutné další léčby. Nikdo další v rodině není přenašečem patogenní *BAP1* mutace.

Se zvyšujícím se rozsahem delece/duplikace klesá podíl zastoupení alely s delecí v celkovém pokrytí. Enrichment/hybridizační postup je výrazně specifitější než amplifikační příprava knihovny a omezuje zanášení chyb v průběhu amplifikace [21].

Další problematickou oblastí jsou geny s pseudogeny. V analyzovaném souboru jsme řešili průkaz detekované přítomnosti mutace v genech *PMS2* a *SBDS*. V těchto případech není možná přímá amplifikace analyzovaných úseků z důvodů vysoké homologie mezi genem a jeho pseudogeny. V případě genu *PMS2* jsme při potvrzení obou mutací mohli vyjít z publikovaného zdroje a optimalizovat „nested“ PCR s publikovanými primery [1]. V případě nonsense mutace v genu *SBDS* c.184A>T/p.Lys62* byla situace složitější. Homologie mezi *SBDS* genem a pseudogenem *SBDSP1* je 97 % a navíc v pozici 184 pseudogenu je T jako standardní nukleotid (*SBDSP1*: NR_024110.1: n.647T; g.72301327T). Již při prvotní přímé amplifikaci exonu 2 bylo ze srovnání vzorku pacientky a několika kontrolních vzorků patrné, že zastoupení c.184A>T odpovídá 50 % u kontrolních vzorků a cca 75 % u vzorku pacientky a zároveň byly ve všech vzorcích přítomny čtyři další varianty odpovídající sekvenci *SBDSP1* pseudogenu. Ke specifické amplifikaci exonu 2 jsme použili publikované vnější primery [2] a vnitřní primery pro „nested“ PCR již byly navoleny softwarem LightScanner Primer Design (Idaho Technology Inc.). Tímto způsobem bylo možné získat produkt specifický pouze pro exon 2 *SBDS* genu bez sekvence pseudogenu.

Klinická validita zahrnuje hodnocení významnosti detekované varianty a odhad míry rizika pro nosiče této varianty. Odhad míry rizika genetických nálezů je klíčový pro klinickou využitelnost panelového testování, které by mělo vést k individuálnímu doporučení pro plán preventivního sledování, cílené medikaci nebo chirurgickým profylaktickým zákrokům, které mohou riziko nádorového onemocnění snížit.

Abychom mohli stanovit klinickou validitu, musíme znát odpověď na tyto základní otázky [20]:

- Jsou mutace v konkrétním genu asociovány s nádorovou predispozicí?
- Které varianty nebo skupiny variant jsou rizikové mutace a pro které typy nádorů?
- Jaká je výše nádorové predispozice vzhledem k incidenci onemocnění?

V oblasti klinického hodnocení je nutné vycházet z výsledků biologického hodnocení nalezené varianty, ze segregčních studií a z dosavadních klinických znalostí o uvedeném genu. U nosičů vysoce rizikových patogenních mutací v genech velkého účinku (vyšší než čtyřnásobné riziko vzhledem k běžné populaci: např. mutace v genech *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *MLH1*, *PTEN*, *APC* atd.) lze navrhnout dispenzarizaci nosičů dle platných doporučení. V případě neznámé klinické validity není vhodné nabízet prediktivní testování zdravých příbuzných, ale odhadnout riziko a navrhnout prevenci dle rodinné anamnézy.

Pro řadu genů z TruSight panelu ale zatím nebyla doporučení stanovena a míra relativního rizika pro heterozygotní nosiče mutací je nejasná.

Dispenzarizace u středně rizikových genů většinou zatím nebyla navržena ani publikována. Incidence středního rizika je uváděna jako cca 2–4násobná v porovnání s rizikem průměrné populace [22]. Kumulací získaných dat (v rámci multicentrických studií) o středně rizikových genech je možné postupně odhalit předpokládanou výši a spektrum nádorových rizik a navrhnout rozsah preventivní péče. Zatím je možné se opírat o publikované informace jednotlivých studií, a především o empirická rizika v testované rodině.

Odhad rizika založený na analýzách v přísně selektované vysoce rizikové skupině rodinných případů nemusí vždy odrážet správnou hodnotu průměrného rizika u nosičů v běžné populaci [20]. V současné době chybí pro naši populaci srovnávací výsledky analýz v dostatečně velké kontrolní skupině – zdravé věkově starší populaci bez nádorové predispozice v osobní nebo rodinné anamnéze.

Detekce nízkorizikových mutací a častých polymorfních variant, u kterých je uváděna spíše modifikace rizika, nemají z klinického hlediska uplatnění. Na vel-

kých genových panelech jsou jejich detekovány desítky a jsou s podobnou frekvencí detekovány také u kontrolních vzorků.

U nosičů patogenních mutací v genech pro známé recesivní syndromy (*FA*, *AT*, *XP*, aj.) je vhodné zvážit podání informace o mutaci z důvodů možného výskytu tohoto syndromu v dalších generacích. Frekvence nosičství mutací v těchto genech je však velmi vzácná a pravděpodobnost autozomálně recesivního syndromu v dalších generacích je nízká. Proto dosud není jasný přístup k této problematice a je vhodné postupovat individuálně.

Závěr

Téměř u poloviny z vyšetřených jedinců byly detekovány patogenní nebo pravděpodobně patogenní (*IARC-4*) mutace v některém z analyzovaných genů. Ztrátové (nonsense, frame-shift) mutace byly detekovány v genech: *ATM*, *BAP1*, *FANCI*, *FANCC*, *PMS2*, *RECQL4*, *SBDS*. Dále bylo nalezeno několik s vysokou pravděpodobností patogenních missense variant nebo „in-frame inzercí/delecí“ v genech: *ATM*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *ERCC2*, *ERCC3*, *ERCC4*, *FANCA*, *MC1R*, *MEN1*, *MRE11A*, *MUTYH*, *PALB2*, *RAD51C*, *RET*, *SDHB*, *STK11*, které se nacházejí ve vysoce konzervovaných funkčních doménách proteinu a některé z nich již byly prokázány jako patogenní mutace pomocí funkčních testů nebo u závažných autozomálně recesivních syndromů (*Ataxia telangiectasia*, *FA*).

Pro klinické využití je nezbytné stanovení relativního rizika, což je v řadě případů ve fázi výzkumných studií. Detekce variant s nízkou penetrancí má pouze limitovanou klinickou využitelnost. Rozšíření spektra analyzovaných genů představuje výzvu pro zajištění odpovídajícího preventivního sledování a léčebných postupů u osob v riziku. Je zapotřebí úzká spolupráce onkologů, klinických genetických, molekulárních biologů a bioinformatiků, aby bylo možné plně využít potenciál NGS technologií v běžné diagnostické praxi a preventivní personalizované onkologii.

V oblasti klinického hodnocení je nutné vycházet z výsledků biologického hodnocení nalezené varianty, ze segregčních studií a z dosavadních klinických

znalostí o uvedeném genu. V případě neznámé klinické validity není vhodné nabízet prediktivní testování zdravých příbuzných, ale odhadnout riziko a navrhnout prevenci dle rodinné anamnézy.

Využití NGS technologie a vyšetření panelů mnoha desítek genů pro hereditární nádorová onemocnění je významným posunem nejen v možnostech prevence nádorových onemocnění u vysoce rizikových osob.

Literatura

1. Vaughn CP, Robles J, Swensen JJ et al. Clinical analysis of PMS2: mutation detection and avoidance of pseudogenes. *Hum Mutat* 2010; 31(5): 588–593. doi: 10.1002/humu.21230.
2. Kawakami T, Mitsui T, Kanai M et al. Genetic analysis of Shwachman-diamond syndrome: phenotypic heterogeneity in patients carrying identical SBDS mutations. *Tohoku J Exp Med* 2005; 206(3): 253–259.
3. Wu Y, Brosh RM. DNA helicase and helicase-nuclease enzymes with a conserved iron-sulfur cluster. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(10): 4247–4260. doi: 10.1093/nar/gks039.
4. De Nicolo A, Tancredi M, Lombardi G et al. A novel breast cancer – associated BRIP1 (FANCF/BACH1) germline mutation impairs protein stability and function. *Clin Cancer Res* 2008; 14(14): 4672–4680. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0087.
5. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet* 2010; 42(5): 406–409.
6. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 2010; 42(5): 410–414. doi: 10.1038/ng.569.
7. Clague J, Wilhoite G, Adamson A et al. RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer cases from high-risk families. *PLoS One* 2011; 6(9): e25632. doi: 10.1371/journal.pone.0025632.
8. Janatova M, Soukupova J, Stribrna J et al. Mutation analysis of the RAD51C and RAD51D genes in high-risk ovarian cancer patients and families from the Czech Republic. *PLoS One* 2015; 10(6): e0127711. doi: 10.1371/journal.pone.0127711.
9. Huck K, Hanenberg H, Gudowius S et al. Delayed diagnosis and complications of Fanconi anaemia at advanced age – a paradigm. *Br J Haematol* 2006; 133(2): 188–197.
10. Berwick M, Satagopan JM, Ben-Porat L et al. Genetic heterogeneity among Fanconi anemia heterozygotes and risk of cancer. *Cancer Res* 2007; 67(19): 9591–9596.
11. Kennedy RD, D'Andrea AD. DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. *J Clin Oncol* 2006; 24(23): 3799–3808.
12. Lemos MC, Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat* 2008; 29(1): 22–32.
13. Wu X, Platt JL, Cascalho M. Dimerization of MLH1 and PMS2 limits nuclear localization of MutLalpha. *Mol Cell Biol* 2003; 23(9): 3320–3328.
14. Herkert J, Niessen R, Olderde-Berends M et al. Paediatric intestinal cancer and polyposis due to bi-allelic PMS2 mutations: case series, review and follow-up guidelines. *Eur J Cancer* 2011; 47: 965–982. doi: 10.1016/j.ejca.2011.01.013.
15. Rahal EA, Henricksen LA, Li Y et al. ATM regulates Mre11-dependent DNA end-degradation and microhomology – mediated end joining. *Cell Cycle* 2010; 9(14): 2866–2877.
16. Edvadsen H, Tefre T, Jansen L et al. Linkage disequilibrium pattern of the ATM gene in breast cancer patients and controls; association of SNPs and haplotypes to radio-sensitivity and post-lumpectomy local recurrence. *Radiat Oncol* 2007; 2: 25–33.
17. Testa JR, Cheung M, Pei J et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet* 2011; 43(10): 1022–1025. doi: 10.1038/ng.912.
18. Janeway KA, Kim SY, Lodish M et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(1): 314–318. doi: 10.1073/pnas.1009199108.
19. Plon SE, Eccles D, Easton D et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 2008; 29(11): 1282–1291. doi: 10.1002/humu.20880.
20. Easton DF, Pharoah PD, Antoniou AC et al. Gene-Panel sequencing and the prediction of breast cancer risk. *N Engl J Med* 2015; 372: 2243–2257. doi: 10.1056/NEJMs1501341.
21. Desai AN, Jere A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clin Gene* 2012; 81(6): 503–510. doi: 10.1111/j.1399-0004.2012.01865.x.
22. Hollestelle A, Wasielewski M, Martens JW et al. Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes. *Curr Opin Genet Dev* 2010; 20(3): 268–276. doi: 10.1016/j.gde.2010.02.009.
23. Ni Y, Zbuk KM, Sadler T et al. Germline mutations and variants in the succinate dehydrogenase genes in Cowden and Cowden-like syndromes. *Am J Hum Genet* 2008; 83(2): 261–268. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.07.011.
24. Park JY, Singh TR, Nassar N et al. Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene* 2014; 33(40): 4803–4812. doi: 10.1038/ncr.2013.421.
25. Machens A, Spitschak A, Lorenz K et al. Germline RET sequence variation I852M and occult medullary thyroid cancer: harmless polymorphism or causative mutation? *Clin Endocrinol* 2011; 75(6): 801–805. doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04158.x.