

VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ BRCA1 A BRCA2 GENŮ V MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ LABORATOŘI MASARYKOVA ONKOLOGICKÉHO ÚSTAVU

THE RESULTS OF TESTING BRCA1 AND BRCA2 GENES IN MOLECULAR GENETIC LABORATORY OF MASARYK MEMORIAL CANCER INSTITUTE

LUKEŠOVÁ M., MACHÁČKOVÁ E., VAŠÍČKOVÁ P., NAVRÁTILOVÁ M., PAVLŮ H., URBÁNKOVÁ V., KUKLOVÁ J., FORETOVÁ L.

ODDĚLENÍ EPIDEMIOLOGIE A GENETIKY NÁDORŮ,
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn

Hlavní příčinou genetické predispozice ke vzniku nádoru prsu a ovaria jsou mutace v genech BRCA1 a BRCA2. Od roku 1999 je v laboratoři Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů Masarykova onkologického ústavu prováděna molekulárně genetická analýza těchto dvou genů. Do října 2005 bylo vyšetřeno 470 žen z vysoce rizikových rodin, 38 patientek se sporadickým výskytem bilaterálního nádoru prsu a/nebo ovaria, 109 patientek se sporadickým výskytem nádoru prsu nebo ovaria do 40 let věku a 14 mužů s karcinomem prsu. U 194 pacientů bylo nalezeno celkem 64 různých patogenních mutací, 30 v BRCA1 genu a 34 v BRCA2 genu. Prediktivním vyšetřením bylo provedeno u 486 symptomatických a presymptomatických příbuzných. Všem nosičům mutace byla nabídnuta preventivní péče na specializovaných pracovištích.

Klíčová slova: BRCA1, BRCA2, genetická predispozice, nádor prsu, nádor ovaria

Summary

Inherited mutations in BRCA1 and BRCA2 are the major reason for the genetic predisposition to breast and ovarian cancer. Molecular genetic analysis of these two genes has been performed in laboratory of Department of Cancer Epidemiology and Genetics in Masaryk Memorial Cancer Institute since 1999. Until October 2005 there have been investigated 470 high-risk breast and breast/ovarian cancer families, 38 patients with bilateral breast or ovarian cancer or both, 109 women diagnosed with early-onset sporadic breast/ovarian cancer below 40 years, and 14 men diagnosed with breast cancer. Concerning disease causing mutations, 64 different germline mutations were found in 194 patients, 30 in BRCA1 gene and 34 in BRCA2 gene. Moreover, predictive testing of 486 symptomatic and nonsymptomatic relatives has been done. Preventive care was offered to all mutation carriers in a specialised clinic.

Key words: BRCA1, BRCA2, genetic susceptibility, breast cancer ovarian cancer

Úvod:

Přibližně 5-7% případů nádorů může být způsobeno monogenní genetickou predispozicí (1). Pro hereditární formy nádorů je typický nízký věk v době stanovení diagnózy a bilaterální výskyt či duplicita. Dědičná predispozice k nádorům je přenášena jako autozomálně dominantní znak s vysokou penetrancí. V roce 1994 a 1995 byly objeveny tumor supresorové geny BRCA1 (chromosom 17q21) a BRCA2 (chromosom 13q12-13), které jsou zodpovědné za podstatnou část případů dědičných forem nádorů prsu nebo vaječníků (2).

V genech BRCA1 a 2 bylo doposud detekováno několik set různých patogenních mutací, které jsou popsány v BIC mutační databázi (3), přičemž nelze pozorovat preferenční výskyt mutací v některé části kódující sekvence. V určitých populacích byla zjištěna vysoká četnost specifických mutací, které zodpovídají za většinu detekovaných mutací v dané populaci. Takovéto případy najdeme například na Islandu nebo v Izraeli (4, 5). Oproti tomu v jiných populacích je nacházeno široké spektrum nejrůznějších mutací (6).

V laboratoři Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů Masarykova onkologického ústavu je screening genů BRCA1 a BRCA2 prováděn od roku 1999 (7).

Metody:

1. klinické

Molekulárně genetické vyšetření genů BRCA1 a BRCA2 je prováděno u indikovaných případů, po genetickém poradenství a podepsání informovaného souhlasu. Kromě probandů zapadajících do testovacích kritérií I.-V. (viz Tab.1) byly vyšetřovány také zdravé ženy z vysoce rizikových rodin, kde již z důvodu úmrtí nebylo možno testovat příbuznou s nádorem prsu nebo ovaria. Detekovaná změna je vždy potvrzena z druhého, nezávisle izolovaného vzorku DNA. Charakterizace mutace a její významnosti je součástí laboratorní zprávy.

Výsledky předává vyšetřovanému klinický genetik s řádným vysvětlením a s případným návrhem prevence. Prediktivní test lze doporučit u příbuzných v riziku starších 18 let v rodinách s detekovanou konkrétní mutací.

2. molekulárně genetické

U pacientů byl proveden kompletní screening kódujících oblastí a míst sestříhu (splice sites) jednotlivých exonů genů BRCA1 (22 kódujících exonů, mRNA = 5711 nt) a BRCA2 (26 kódujících exonů, mRNA = 10987 nt).

Genomická DNA byla izolována z lymfocytů periferní krve za pomoci izolačního kitu firmy Qiagen. Jako screeningové testy k vyhledávání blíže neurčených mutací byly použity tyto metody: „protein truncation test“ (PTT) a heteroduplexní ana-

lýza (HA). Neradioaktivní PTT byl prováděn u exonu 11 BRCA1 genu a u exonů 10 a 11 BRCA2 genu. U všech zbývajících exonů obou genů byl proveden screening metodou HA. Přesný postup molekulárně biologické analýzy včetně použitých primerů byl podrobně popsán v publikaci Claes et al. (8).

Fragmenty s aberantní mobilitou detekované pomocí PTT nebo HA testu byly sekvenovány metodou přímého sekvenování na ALFexpress™ DNA automatickým sekvenátorem (Pharmacia). Každá detekovaná mutace byla potvrzena z nového, nezávisle izolovaného vzorku DNA pacienta.

Tab.1: Kritéria pro zařazení do jednotlivých skupin

I.	3 a více příbuzných diagnostikovaných s nádorem prsu/ovária v jakémkoli věku, nebo alespoň 2 příbuzní - jeden z nich diagnostikován s bilaterálním nádorem nebo nádorem prsu a ovária
II.	2 příbuzní s nádorem prsu/ovária - alespoň jeden diagnostikován pod 50 let
III.A	pacientka s bilaterálním nádorem prsu s první diagnózou pod 50 let
III.B	pacientka s bilaterálním nádorem ovária s první diagnózou pod 50 let
III.C	pacientka s nádorem prsu a vaječníku s první diagnózou pod 50 let
IV.	sporadické případy diagnostikované pod 40 let
V.	muž s nádorem prsu diagnostikovaným v jakémkoli věku

Tab.2: Celkový záchyt mutací v závislosti na indikačních kritériích

Kritéria zařazení a fenotyp	Počet rodin pacientů	BRCA1 mutace (%)	BRCA2 mutace (%)	Celkem mutací (%)
I. HOC+HBOC	93	47 (50,5%)	7 (8,1%)	54 (59,3%)
II. HBC	169	31 (18,3%)	21 (13,2%)	52 (32,1%)
I. Celkem	262	78 (29,8%)	28 (11,4%)	106 (41,6%)
II. HOC+HBOC	31	17 (54,8%)	1 (3,2%)	18 (58,0%)
III. HBC	177	19 (10,7%)	19 (10,7%)	38 (21,4%)
II. Celkem	208	36 (17,3%)	20 (9,6%)	56 (26,9%)
I.+II. Familiární případy HOC+HBOC	124	64 (51,6%)	8 (6,5%)	72 (58,1%)
I.+II. Familiární případy HBC	346	50 (14,5%)	40 (11,5%)	90 (26,0%)
I.+II. Celkem	470	114 (24,3%)	48 (10,2%)	162 (34,5%)
III.A Pacientky s bilaterálním karcinomem prsu	19	3 (15,8%)	1 (5,3%)	4 (21,1%)
III.B Pacientky s bilaterálním karcinomem ovária	7	1 (14,3%)	0	1 (14,3%)
III.C Pacientky s karcinomem prsu a ovária	12	9 (75,0%)	2 (16,7%)	11 (91,7%)
III. Celkem	38	13 (34,2%)	3 (7,9%)	16 (42,1%)
IV. Pacientky <40 let s karcinomem ovária	17	1 (5,9%)	0	1 (5,9%)
IV. Pacientky <40 let s karcinomem prsu	92	7 (7,6%)	4 (4,4%)	11 (12,0%)
IV. Celkem	109	8 (7,3%)	4 (3,7%)	12 (11,0%)
V. Muži s karcinomem prsu	14	1 (7,1%)	3 (21,4%)	4 (28,6%)

Zkratky: HOC - dědičný syndrom nádoru ovária; HBOC - dědičný syndrom nádoru prsu a ovária; HBC - dědičný syndrom nádoru prsu; mutace - pouze patogenní mutace

Výsledky:

Do října 2005 byla molekulárně genetická analýza genů BRCA1 a BRCA2 ukončena u 470 žen z vysoce rizikových rodin, 38 pacientek se sporadickým výskytem bilaterálního nádoru prsu a/nebo ovária, 109 pacientek se sporadickým výskytem nádoru prsu nebo ovária do 40 let věku a 14 mužů s karcinomem prsu. U probandů bylo nalezeno celkem 64 různých patogenních mutací (30 v BRCA1 genu a 34 v BRCA2 genu), které byly rozptýleny podél celé kódující sekvence obou genů. Celkový záchyt mutací u probandů, kteří byli dle indikačních kritérií zařazení do skupiny I.-V. je znázorněn v tabulce 2. Screening genů BRCA1 a 2 byl proveden také u 40 zdravých žen s vysoce pozitivní rodinnou anamnézou, přičemž u devíti z nich (22,5%) byla detekována patogenní mutace v BRCA1 nebo BRCA2 genu.

Nejčastěji detekovanými mutacemi byly: c.5385dupC (59 případů), c.3819_3823delGTAAA (23 případů), c.300T>G (18 případů) v BRCA1 genu a c.8138_8142delCCTTT (14 případů), c.8765_8766delAG (10 případů) v BRCA2 genu. Těchto pět mutací dohromady představuje 54 % všech detekovaných mutací (viz. Graf 1). Patogenních mutace, které byly u vyšetřovaných probandů detekovány je možno rozřadit dle typu mutace a jejího důsledku (viz Graf 2). Nejčastěji byly detekovány mutace způsobující předčasnou terminaci translace a vedou k odstranění významné funkční domény proteinu. Jedná se konkrétně o inserce a delece způsobující posun čtecího rámce „frame shift“ a vznik předčasného terminačního kodonu a „nonsense“ substituce způsobující v místě záměny vznik terminačního kodonu. Dalším typem detekovaných mutací byly mutace měnící místo sestřihu a nukleotidové substituce, které způsobí záměnu aminokyseliny v důležité funkční doméně proteinu.

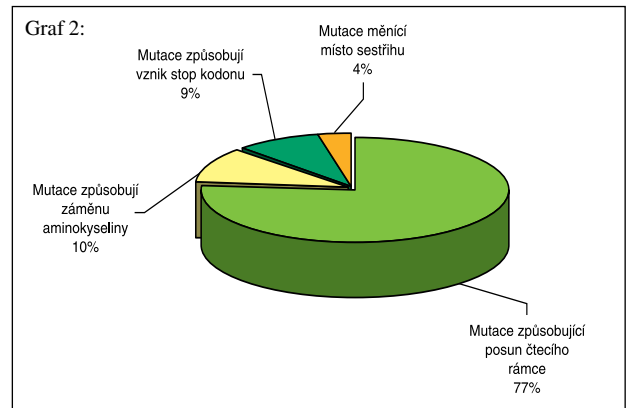
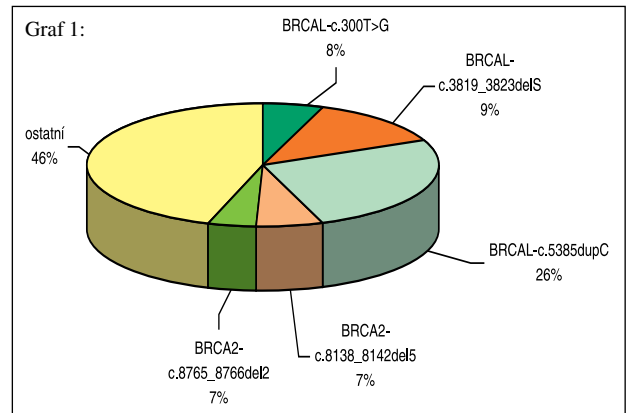
Kromě častých nepatogenních polymorfismů byly u všech skupin pacientek zachyceny vzácné sekvenční varianty nejasného významu. Tyto sekvenční varianty jsou z hlediska interpretace problematickou skupinou a v současné době nelze s jistotou určit, zda by mohla některá z těchto detekovaných variant souviset s nádorovým onemocněním pacientky nebo zda se jedná o neutrální (polymorfni) variantu bez vlivu na fenotyp. Prediktivní testování příbuzných na konkrétní mutaci zodpovědnou za segregaci onemocnění v rodině bylo provedeno u 486 osob. Pozitivní výsledek (vyšetřovaný je nosičem dané mutace a s určitou pravděpodobností bude v budoucnu trpět danou nemocí) byl zjištěn u 165 presymptomatických jedinců. Negativně testovaní jedinci nejsou nosiči dané mutace a riziko pro vznik nádoru by u nich mělo být na úrovni rizika běžné populace bez genetického zatížení. Prediktivní test umožňuje cílené preventivní opatření pouze u osob s významným genetickým rizikem.

Prediktivní testování příbuzných na konkrétní mutaci zodpovědnou za segregaci onemocnění v rodině bylo provedeno u 486 osob. Pozitivní výsledek (vyšetřovaný je nosičem dané mutace a s určitou pravděpodobností bude v budoucnu trpět danou nemocí) byl zjištěn u 165 presymptomatických jedinců. Negativně testovaní jedinci nejsou nosiči dané mutace a riziko pro vznik nádoru by u nich mělo být na úrovni rizika běžné populace bez genetického zatížení. Prediktivní test umožňuje cílené preventivní opatření pouze u osob s významným genetickým rizikem.

Prediktivní test umožňuje cílené preventivní opatření pouze u osob s významným genetickým rizikem.

Diskuze:

Nejvyšší pravděpodobnost záchytu kauzální mutace v genu BRCA1 je v rodinách s anamnézou nádoru prsu a ovária. Pravděpodobnost záchytu BRCA1 nebo BRCA2 mutace pak narůstá s počtem diagnostikovaných případů v rodině a s klesajícím věkem v době diagnózy. U mužů diagnostikovaných s karcinomem prsu je více pravděpodobné, že bude nalezena mutace v genu BRCA2. Situaci vystihuje tabulka 2.



Faktu, že 3 mutace v BRCA1 a 2 mutace v BRCA2 genu představují 54 % všech detekovaných mutací byl přízpůsoben mutační screening. Pomocí heteroduplex analýzy a restriktivní analýzy jsou probandi testováni nejdříve na přítomnost těchto pěti nejčastějších mutací, což umožňuje významně zkrátit dobu vyšetření a také finanční náročnost.

U vysoce rizikových pacientů je však naprosto opodstatněné provést kompletní analýzu obou BRCA genů, neboť patogenní mutace jsou roztroušeny podél celé kódující sekvence těchto genů.

Spektrum mutací detekovaných na území České republiky je značně rozsáhlé. Spolu s výsledky, které publikoval Pohlreich a kolektiv z Ústavu biochemie a experimentální onkologie I.LF UK Praha (9), bylo v České republice zachyceno již 35 různých mutací v BRCA1 genu a 38 různých mutací v BRCA2 genu a tento výčet s vysokou pravděpodobností nebude úplný. Vzhledem k tomu, že onkologické onemocnění se projevuje v dospělosti a často již po ukončení reprodukčního období, byl selektivní tlak proti nosičům BRCA mutace minimální a mutace se v populaci v heterozygotním stavu úspěšně udržely.

Velké množství různých mutací také svědčí o značné heterogenitě české populace, která odpovídá historickým událostem. Vysoký byl zachyt patogenních mutací (22,5%) u zdravých pacientek z vysoce rizikových rodin, kde nebylo možno testovat příbuzné s nádorovým onemocněním z důvodu úmrtí. Ukazuje se, že také tyto ženy jsou vhodnou indikační skupinou pro screening genů BRCA1 a BRCA2.

Pokud se u pacientky s vysoce rizikovou anamnézou nepodařilo detekovat patogenní mutaci v BRCA1 nebo BRCA2 genu, nelze samozřejmě vyloučit genetickou predispozici. Predispoziční mutace může být v této rodině přítomna, ale:

a) není zachytitelná zvolenými screeningovými metodami

(např. intragenové přeskupení, kauzální mutace v promotorových nebo intronových oblastech genu)

b) mutační screening mohl být proveden u osoby, která je fenokopii (náhodný sporadický nádor u osoby, která není nosičem predispoziční mutace)

c) za predispozici k nádorovému onemocnění v rodině je zodpovědná kumulace rizikových genetických faktorů (např. kombinace nepříznivých alel více genů s nízkou penetrancí) a negenetických faktorů.

Pokud nebyla v kódující sekvenci BRCA1 nebo BRCA2 genu vyšetřovaného, vysoce rizikového probanda nalezena žádná patogenní mutace, zůstává tento pacient nadále v registru rodin s vysokou dědičnou zátěží a může být v budoucnu zařazen do dalších vyšetření jako je MLPA nebo Southern blot analýza, k vyšetření senzitivnější screeningovou metodou, vyšetření regulačních nebo intronických oblastí BRCA1 a BRCA2 genů nebo pro vyšetření jiných genů, které mohou vytvářet predispozici k nádorovému onemocnění.

Závěr:

Při molekulárně genetické analýze genů BRCA1 a BRCA2 byla u rizikových pacientů nalezena široká škála mutací, které jsou rozptýleny podél celé kódující sekvence obou genů. Tři mutace v BRCA1 genu a dvě mutace v BRCA2 genu se ovšem vyskytují s vysokou četností a dohromady tvoří více než 50% všech detekovaných mutací. Proto je vhodné vyšetřit pacienty nejdříve na přítomnost těchto pěti mutací a dále potom pokračovat v kompletní analýze obou BRCA genů. Pacientům, u kterých byla detekována mutace, lze nabídnout dispenzarizaci ve specializovaných centrech a navrhnout prevenci.

Tato práce byla sponzorována grantem IGA MZČR NR/8213-3 a MZO 00209805.

Literatura:

1. Newman B, Austin MA, Lee M, et al. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high risk families. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:3044-3048.
2. Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. Am J Hum Genet 1998; 62:767-689.
3. Breast Cancer Information Core Internet Website (BIC database). <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>
4. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. Nat Genet 1996; 14:185-187.
5. Thorlacius S, Sigurdsson S, Bjarnadottir H, et al. Study of a single BRCA2 mutation with a high carrier frequency in a small population. Am J Hum Genet 1997; 60:1079-1084.

6. Szabo CL, King M-C. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. Am J Hum Genet 1997; 60:1013-1020.
7. Foretova L, Machackova E, Navratilova M, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian cancer in the Czech Republic. Hum Mutat. 2004; Apr;23(4):397-8.
8. Claes K, Machackova E, De Vos M, et al. Mutation analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes results in the identification of novel and recurrent mutations in 6/16 Flemish families with breast and/or ovarian cancer but not in 12 sporadic patients with early-onset disease. Hum Mutat. 1999; 13:256.
9. Pohlreich P, Zikán M, Stribrna J, et al. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. Breast Cancer Res. 2005; 7:R728-R736.