

Pilotná analýza mutácií génov asociovaných s Lynchovým syndrómom u slovenských pacientov s rakovinou prsníka

Pilot study of gene mutations associated with Lynch syndrome in Slovak patients with breast cancer

Krasničanová L.¹, Saade R.¹, Priščáková P.¹, Gbelcová H.¹, Kaľavská K.², Karaba M.³, Benca J.^{3,4}, Mego M.^{2,5}, Repiská V.¹

¹ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice Bratislava, Slovenská republika

² Jednotka translačného výskumu, Lekárska fakulta Univerzity Komenského a Národný onkologický ústav, Bratislava, Slovenská republika

³ Klinika chirurgickej onkológie, Národný onkologický ústav, Bratislava, Slovenská republika

⁴ Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, n.o., Bratislava, Slovenská republika

⁵ II. onkologická klinika, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Národný onkologický ústav, Bratislava, Slovenská republika

Súhrn

Východiská: Lynchov syndróm (LS) je autozomálne dominantné dedičné ochorenie, ktoré sa prejavuje zvýšením rizika vzniku nádorových ochorení, a to predovšetkým kolorektálneho a endometriálneho karcinómu. Nedávne štúdie preukázali aj asociáciu medzi LS a nádorovým ochorením prsníka. Cieľom tejto štúdie je poukázať na možný výskyt prítomnosti mutácií v génoch asociovaných s LS u pacientov s rakovinou prsníka a na potrebu zahrnúť vyšetrenie Lynch asociovaných génov u pacientov s familiárnym a opakovaným výskytom rakoviny prsníka ako aj s výskytom ďalších Lynch asociovaných nádorových ochorení. **Materiál a metódy:** Analyzovali sme vzorky nádorového tkaniva od 78 pacientov s primárnym nádorom prsníka. U pacientov sme analyzovali panel génov asociovaný s rizikom vzniku rakoviny prsníka, pričom sme sa v rámci našej štúdie sústredili primárne na výskyt mutácií v mismatch-repair génoch. DNA izolovaná z nádorového tkaniva bola sekvenovaná pomocou metódy sekvenovania novej generácie (next generation sequencing – NGS) a podrobená analýze pomocou nástroja Ingenuity Variant Analysis. Na potvrdenie zárodnočnej mutácie sme vyšetrili krvnú vzorku pacientky pomocou NGS. **Výsledky:** V rámci našej analýzy sa nám v nádorovom tkanive prsníka podarilo identifikovať variant v géne *PMS2* u jednej pacientky. Prítomnosť mutácie naznačuje, že vzniknuté nádorové ochorenie môže byť následkom LS. Z hľadiska patogenity sa jednalo o pravdepodobne patogénny variant, nakoľko sme odhalili deléciu v exónovej oblasti, ktorá viedla k frameshift mutácii. Navyše sme identifikovali aj jednonukleotidové patogénne varianty v génoch *TP53* a *PIK3CA*. Pre definitívne stanovenie diagnózy LS u pacientky sme vyšetrili krvnú vzorku, kde sme tiež identifikovali mutáciu génu *PMS2*. **Záver:** LS je u mnohých Lynch asociovaných nádorových ochorení poddiagnostikovaný. V prípade familiárneho výskytu rakoviny prsníka a ďalších Lynch asociovaných génov je však dôležité myslieť aj na možnú diagnózu LS a v prípade, že pacient spĺňa diagnostické kritéria, uskutočniť aj genetické vyšetrenie Lynch asociovaných génov.

Kľúčové slová

Lynchov syndróm – rakovina prsníka – MMR gény – MLH1 – MSH2 – MSH6 – PMS2

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

The authors declare that 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 zaslané do biomedicínských časopisů.

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



Mgr. Lucia Krasničanová
Ústav lekárskej biológie, genetiky
a klinickej genetiky LF UK a UN
Bratislava
Sasinkova 4
811 08 Bratislava
Slovenská republika
e-mail: luciakrasnicanova@gmail.com

Obdrženo/Submitted: 6. 9. 2022

Přijato/Accepted: 29. 12. 2022

doi: 10.48095/ccko2023130

Summary

Background: Lynch syndrome (LS) is an autosomal dominant inherited disorder which causes an increased risk of cancer, especially colorectal and endometrial carcinomas. Recent studies have shown an association between LS and breast cancer as well. The aim of our study is to highlight the possible presence of mutations in genes associated with LS in patients with breast cancer and the need to include the examination of Lynch-associated genes in patients with a family history of breast cancer as well as in patients with recurrent breast cancer, as well as with the occurrence of other Lynch-associated cancer. **Materials and methods:** We analyzed tumor tissue samples from 78 patients with primary breast cancer. Our samples were tested with a gene panel associated with the risk of developing breast cancer, while in our study we focused primarily on the occurrence of mutations in mismatch-repair genes. DNA isolated from tumor tissue was sequenced using next generation sequencing (NGS) and analyzed using the Ingenuity Variant Analysis tool. To confirm the germline mutation, we examined the patient's blood sample using NGS sequencing. **Results:** As a result of our analysis, we managed to identify a mutation in the *PMS2* gene in one patient's breast tumor tissue. The presence of this mutation indicates that the resulting cancer may be a consequence of LS. As for pathogenicity, this was probably a pathogenic variant, as we detected deletions in the exon region, which led to frameshift mutation. Moreover, we also identified single-nucleotide pathogenic variants in the *TP53* and *PIK3CA* genes. To definitively establish the diagnosis of LS in the patient, we examined a blood sample, where we also identified a mutation of the *PMS2* gene. **Conclusion:** LS is underdiagnosed in many Lynch-associated cancers. However, in the case of a familial occurrence of breast cancer and other Lynch-associated genes, it is important to think about a possible diagnosis of LS and, if the patient meets the diagnostic criteria, to carry out a genetic examination of Lynch-associated genes.

Key words

Lynch syndrome – breast cancer – MMR genes – MLH1 – MSH2 – MSH6 – PMS2

Úvod

Lynchov syndróm

Lynchov syndróm (LS) je autozomálne dominantné dedičné ochorenie, pri ktorom je typicky pozorovaná zárodočná mutácia v tzv. Lynch asociovaných génoch *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2* nazývaných mismatch-repair (MMR) gény. Tie sú zodpovedné za reparáciu chybných včlenených nukleotidov a tiež malých inzercí a delécií, vznikajúcich počas replikácie DNA [1]. To vedie k hromadeniu mutácií v genóme MMR deficientných buniek, pričom k najvýraznejšiemu prejavu dochádza v krátkych repetitívnych sekvenciách DNA tvoriacich tzv. mikrosatelity [2]. Mutácie MMR génov sú asociované so signifikantne zvýšeným rizikom vzniku kolorektálneho karcinómu (colorectal cancer – CRC) a endometriálneho karcinómu (endometrial cancer – EC). Okrem toho mutácie v MMR génoch vedú aj k zvýšenému riziku vzniku nádorov vaječníkov, tenkého čreva, urotelu, obličiek, mozgu, pečene, žľazových ciest a žalúdka, ktoré spoločne nazývame aj nádory asociované s LS [3].

Asociácia LS s rakovinou prsníka

Niektoré štúdie preukázali aj asociáciu medzi rakovinou prsníka a LS. Retrospektívna štúdia od Roberts et al z roku 2018, poukázala na prepojenie medzi Lynch asociovanými génmi *MSH6* a *PMS2* a rizikom vzniku rakoviny prsníka. V štúdiu boli analyzované vzorky od vyše 50 000 pa-

cientok, medzi ktorými detegovali mutáciu v MMR génoch u 423 z nich, pričom vyše 25 % z nich (107/423) malo počas života rakovinu prsníka. V rámci tejto štúdie boli najčastejšie objavené mutácie v už spomínaných génoch *MSH6* (33,1 %) a *PMS2* (29,3 %) [4]. Tak tiež retrospektívna štúdia od Schwartz et al (2022) dokázala etiologické prepojenie medzi deficienciou MMR mechanizmu a vznikom rakoviny prsníka. Štúdia analyzovala vyše 20 000 pacientov oboch pohlaví s nádorovým ochorením, identifikovaných bolo 272 pacientov s LS, pričom 5 % z nich boli pacientky s nádorovým ochorením prsníka [5]. Vzhľadom na skutočnosť, že LS sa najčastejšie prejavuje vznikom kolorektálneho a endometriálneho karcinómu, uskutočňuje sa skrining deficiencie MMR génov najbežnejšie u pacientov postihnutých CRC a EC, v niektorých krajinách dokonca u všetkých pacientov, zatiaľ čo skrining LS pri ďalších Lynch asociovaných nádorových ochoreniach sa v klinickej praxi rutinne nevykonáva. To môže viesť k poddiagnostikovaniu LS pri jednotlivých typoch nádorových ochorení. [4]. Prevalencia LS v populácii sa odhaduje približne 1 : 279 jedincov. U pacientov sa môže toto ochorenie prejavovať niektorým z Lynch asociovaných nádorových ochorení [6]. Z mnohých štúdií vyplýva, že zatiaľ čo pri CRC sú pozorované mutácie prevažne v génoch *MLH1* a *MSH2*, so zvýšením rizika rako-

viny prsníka sú asociované najmä mutácie génov *PMS2* a *MSH6* [4].

Význam diagnostiky LS u pacientov s rakovinou prsníka

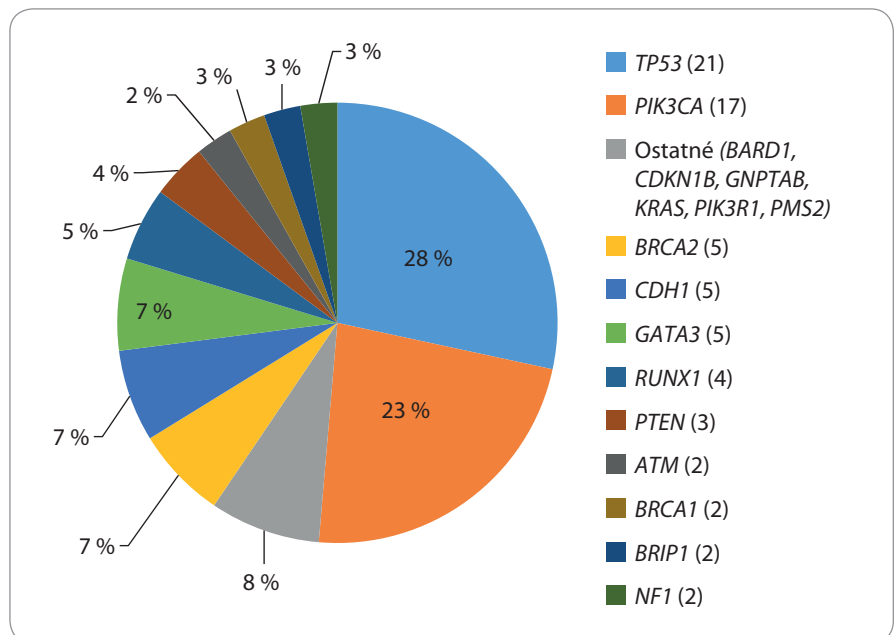
Podľa celosvetovej štatistiky GLOBOCAN 2020 uverejnenej Medzinárodnou agentúrou pre výskum rakoviny, ktorá vypracováva štatistiky incidencie a mortality nádorových ochorení je rakovina prsníka pri vyše 2,25 milióna novodiagnostikovaných prípadoch z hľadiska incidencie na prvom mieste. Z hľadiska mortality nádorových ochorení sa rakovina prsníka nachádza celosvetovo na piatej priečke a tvorí pri celkovom počte necelých 685 tisíc, takmer 7 % z celkového počtu úmrtí na nádorové ochorenia [7]. Vzhľadom na celosvetový nárast incidencie aj mortality rakoviny prsníka stojí určite za zmienku výskum mutácií Lynch asociovaných génov u pacientov s anamnézou spĺňajúcou kritériá pre jeho diagnostiku. Problémom však často býva skutočnosť, že pre nedostatok času nie je u pacientok s rakovinou prsníka zisťovaná rodinná anamnéza dostatočne aj so zreteľom na výskyt iných nádorových ochorení. Pritom už len samotná hereditárna forma rakoviny prsníka býva v nezanedbateľnom množstve zapríčinená LS, na čo poukazuje štúdia autorov Nikitin et al (2020), kde bolo v rámci pozorovanej skupiny 711 pacientok s hereditárnou formou nádorového ochorenia prsníka identifikovaných až 32 pacien-

tok s patogénnym alebo pravdepodobne patogénnym variantom MMR génov [8]. Rozhodli sme sa preto v rámci našej analýzy mutačného profilu zo vzoriek nádorového tkaniva prsníka od 78 slovenských pacientok s potvrdeným primárnym nádorovým ochorením prsníka zamerať aj na pilotný výskum prítomnosti mutácií v MMR génoch.

Materiál a metódy

Táto štúdia bola schválená Nezávislou etickou komisiou Národného onkologického ústavu na Slovensku (Bratislava, Slovenská republika). Pred zaradením do štúdie bol od každého účastníka získaný písomný informovaný súhlas.

V rámci nášho výskumu sme použili tkanivo primárneho nádoru prsníka od 78 pacientok s primárnym nádorom prsníka, ktoré boli súčasťou štúdie autorov Mego et al (2020) [9], odobraté počas operácie a následne uskladnené v tekutom dusíku. Jednalo sa o náhodný súbor pacientok s nádorovým ochorením prsníka v štádiách I–III, ktoré boli ochotné zúčastniť sa na štúdiu, pričom pacientky podstúpili diagnostické vyšetrenia pre vylúčenie prítomnosti vzdialených metastáz. Zmrazené nádorové tkanivo sme homogenizovali v trecích miskách pomocou mažiara. Následne sme z buniek izolovali DNA pomocou kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) podľa protokolu uvádzaného výrobcom. Na vychytanie a obohatenie úsekov nami vybraných analyzovaných génov, ktoré sme zvolili na základe najvýznamnejšej klinickej relevancie v súvislosti s rakovinou prsníka podľa Lawrence et al [10], sme použili kit SureSelect^{QXT} (Agilent Technologies), pričom sme postupovali podľa pokynov udávaných výrobcom. Následne sme vytvorili DNA knižnicu využitím SureSelect^{QXT} Target Enrichment Kit (Agilent Technologies) na prípravu knižníc podľa protokolu pre Illumina Multiplex sekvenovanie. Finálne knižnice sme nariadili na koncentráciu 13–20 pmol/l. Na sekvenovanie sme využili MiSeq reagent Kit v3 150 cycles (Illumina). Čítania získané NGS sekvenovaním boli následne namapované na ľudský referenčný genóm, pričom oblasti, v ktorých boli sekvenovaním zistené varianty boli anotované a filtrované pomo-



Graf 1. Frekvencia a konkrétne typy génov, v ktorých sme identifikovali patogénne a pravdepodobne patogénne varianty v nami vyšetřovanom súbore pacientov.

cou nástroja Ingenuity Variant Analysis (Qiagen), pričom sme sa zamerali na Lynch asociované gény *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. Identifikované patogénne a pravdepodobne patogénne varianty sme verifikovali vizualizáciou pomocou nástroja Integrative Genomics Viewer (Broad Institute). Vzorku pacientky č. 63, v ktorej sme identifikovali mutáciu v géne *PMS2* sme následne podrobili aj analýze DNA izolovanej z periférnej krvi aby sme zistili, či sa jedná o zárodočnú mutáciu. DNA sme izolovali pomocou kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) podľa protokolu uvádzaného výrobcom. Následne sme amplifikovali vybraný fragment génu *PMS2* pomocou nami navrhnutého páru primerov (forward: CAGGAGTATGCCAAAATGGTCCAGGTCTTACATG, reverse: GGGCCATCTGCGGTAGACTTCTGTAAATG) pomocou kitu na long range polymerase chain reaction (PCR): LA PCR Kit, Version 2.1 pričom sme postupovali podľa pokynov udávaných výrobcom. Knižnicu sme vytvorili využitím Nextera XT DNA Library Preparation Kit a fragment sme následne osekvenovali pomocou Illumina NextSeq 2000 podľa pokynov výrobcu a čítania boli namapované na ľudský referenčný genóm a vizualizované pomocou nástroja Integrative Genomics Viewer.

Výsledky

Pri analýze variantov nachádzajúcich sa v nádorovom tkanive sme detegovali množstvo mutácií v génoch asociovaných so vznikom rakoviny prsníka (graf 1). Zo súboru sme museli vylúčiť 6 vzoriek v dôsledku nedostatočnej kvality DNA pre analýzu. Naším hlavným cieľom bolo zamerať sa na detekciu mutácií asociovaných s LS, teda na základe výsledkov z publikácie od Roberts et al (2018) išlo predovšetkým o mutácie v génoch *MSH6* a *PMS2* [4]. V géne *MSH6* sa nám nepodarilo v skúmaných vzorkách identifikovať ani jednu mutáciu. Podarilo sa nám detegovať mutáciu v géne *PMS2* u pacientky č. 63. Identifikovaná mutácia v géne *PMS2* bola deľcia v exónovej oblasti a viedla k frameshift mutácii (tab. 1). Na základe získaných dát zo sekvenovania DNA, program Ingenuity Variant Analysis vyhodnotil identifikovaný variant z hľadiska patogénnosti ako pravdepodobne patogénny.

Okrem variantu identifikovanom v géne *PMS2* u pacientky č. 63 sme detegovali aj variant v géne *TP53*, pričom sa jednalo o nonsense mutáciu (tab. 1). Identifikovaný variant vyhodnotil program Ingenuity Variant Analysis z hľadiska patogénnosti ako patogénny.

U pacientky č. 63 sa nám tiež podarilo identifikovať patogénny variant v géne *PIK3CA*, ktorý sa nachádzal v oblasti exónu. Konkrétne sa jednalo o transkripčný variant c.3140A>G, ktorý zapríčinil missense mutáciu, konkrétne zmenu histidínu za arginín (tab. 1).

Prítomnosť zárodočnej mutácie génu *PMS2* sme potvrdili následným vyšetrovaním krvnej vzorky pacientky.

Diskusia

Úroveň diagnostiky LS

Hoci nádorové ochorenie prsníka nepatrí v prípade LS k tým najčastejším, je určite potrebné poukázať na fakt, že v prípade pacientov, u ktorých má rakovina prsníka familiárny výskyt, môže byť tento zapríčinený aj mutáciou v Lynch asociovaných génoch. Roberts et al (2018) poukázali na zvýšené kumulatívne riziko vzniku rakoviny prsníka u pacientov s patogénnymi variantmi v génoch *MSH6* a *PMS2* vo veku > 60 rokov a to až na 31,1 resp. 37,7 % oproti odhadovanému riziku v bežnej populácii [4].

V prípade nami analyzovaných pacientov sme sa nezameriavali na analýzu pacientov s familiárnym výskytom rakoviny prsníka, nakoľko sme sa snažili detegovať výskyt týchto mutácií v bežnej vzorke pacientov s rakovinou prsníka. Cieľom našej práce bolo najmä poukázať na to, že pri analýze náhodných vzoriek pacientov s rakovinou prsníka sa môžu vyskytnúť mutácie v MMR génoch, čo by si mali uvedomovať najmä lekári pri odoberaní anamnézy u onkologického pacienta, ktorí rozhodujú o tom, či bude pacient zaslaný na genetické vyšetrenie. U takejto pacientky sa pritom nemusí jednať o familiárny výskyt rakoviny prsníka, ale LS sa v danej rodine môže prejavovať širším spektrom Lynch asociovaných nádorových ochorení.

Hoci sa nám podarilo v analyzovanej skupine pacientov identifikovať len jednu pacientku s mutáciou v Lynch asociovaných génoch spojených s rizikom vzniku rakoviny prsníka, je potrebné upozorniť na fakt, že práve mutácie v génoch *MSH6* a *PMS2* tvoria len 10 % mutácií MMR génov u všetkých pacientov s LS a zvyšných približne 90 % mutácií je lokalizovaných v génoch *MLH1* a *MLH2* asociovaných prevažne

s rizikom vzniku CRC [3], čo znamená, že aj výskyt rakoviny prsníka v súvislosti s LS bude nižší ako v prípade CRC. Hoci by sa mohlo zdať, že diagnostika LS u pacientov s rakovinou prsníka nemá široké využitie, vyššie spomenutá štúdia od Roberts et al (2018) poukazuje na fakt, že v štúdiu s pacientmi, ktorá sa nezameriavala na pacientov s rodinným výskytom nádorových ochorení, bolo identifikovaných približne 0,85 % jedincov, ktorí mali aspoň jednu mutáciu v MMR génoch [4].

Práve pomerne slabé povedomie o asociácii LS s menej častými nádorovými ochoreniami vyskytujúcimi sa pri LS má za následok, že sa diagnostika tohto ochorenia u pacientov s rakovinou prsníka nerealizuje v potrebnom množstve, hoci po podrobnom zisťovaní anamnézy by pacient spĺňal diagnostické kritéria a to najmä, ak by sa jednalo rodinnú anamnézu vzhľadom na výskyt CRC a EC. Súčasná diagnostika LS tak prebieha najmä u pacientov, u ktorých sa aktuálne vyskytuje nádorové ochorenie, najmä CRC, a to hlavne v mladšom veku, než je priemerný vek nástupu ochorenia, prípadne, ak je v rodine viacero členov postihnutých nádormi asociovanými s LS alebo v prípade, že je v rodine postihnutých viacero generácií jedným typom nádorového ochorenia [11].

Potenciál diagnostiky LS

Vzhľadom na potenciál prevencie nádorových ochorení identifikáciou LS u pacientov, u ktorých sa ešte nádorové ochorenie nevyskytlo sa však toto ochorenie javí značne poddiagnostikované. Odhaduje sa, že len u 2 % pacientov trpiacich LS je toto ochorenie aj reálne diagnostikované. Včasná diagnostika pritom môže pomôcť aj pacientom s nádorovým ochorením podniknutím krokov v prevencii rozvinutia ďalších Lynch asociovaných nádorových ochorení [12,13]. Pre tento účel je však potrebné neustále zvyšovať povedomie o LS medzi lekármi. Prekážkou pri identifikácii LS a postúpenie pacienta na genetické testovanie je často nedostatočná úroveň povedomia poskytovateľov zdravotnej starostlivosti o možnostiach genetického testovania a tiež limitovaný čas, ktorý môžu lekári pacientovi venovať a získať detailnú rodinnú anam-

nézu [14]. Keďže LS je hereditárne ochorenie, diagnostikovanie tohto syndrómu u príbuzných pacienta môže včasne upozorniť na zvýšené riziko možnosti rozvinutia nádorových ochorení, ktoré predstavuje u pacientov s LS v niektorých prípadoch až 80 % [12,13].

Pre správnu diagnostiku je potrebné vyšetriť krvnú vzorku pacienta, vďaka ktorej je možné u pacienta potvrdiť zárodočnú mutáciu MMR génov. Tento spôsob diagnostiky patrí medzi neinvazívne diagnostické metódy a nepredstavuje pre pacienta zvýšenú fyzickú ani psychickú záťaž ako je tomu v prípade diagnostiky pomocou biopsie pri už vzniknutom nádorovom ochorení.

Záver

V rámci pilotnej analýzy sa nám pomocou NGS sekvenovania podarilo identifikovať spomedzi 78 vzoriek mutáciu v géne *PMS2* u jednej pacientky s rakovinou prsníka. Jednalo sa o pravdepodobne patogénny variant, ktorý na úrovni proteínu viedol k frameshift mutácii. Napriek tomu, že bol nami analyzovaný počet vzoriek len 78, pričom sa nejednalo o pacientky, u ktorých by bola potvrdená pozitívna rodinná anamnéza rakoviny prsníka, podarilo sa nám identifikovať mutáciu v géne asociovanom s LS. Vzhľadom na fakt, že nádorové ochorenie prsníka je najčastejším z hľadiska incidencie, bolo našim cieľom najmä poukázať na dôležitosť vyhľadávania pacientov s LS, čo je však možné najmä po dôkladnom anamnestickom vyšetrení a dostatočnom povedomí lekárov aj o menej častých Lynch asociovaných nádorových ochoreniach.

Podporujúce agentúry a sponzori

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci podpory projektu APVV-16-0010 and APVV-14-0327 finančnou Agentúrou na podporu výskumu a vývoja a Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dlhodobý strategický výskum a vývoj zameraný na výskyt Lynchovho syndrómu v populácii SR a možnosti prevencie nádorov spojených s týmto syndrómom, kód ITMS: 313011V578, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Dušek M, Hadravský L, Černá K et al. Diagnóza Lynchova syndromu od patologa. *Klin Onkol* 2016; 29(3): 180–186. doi: 10.14735/amko2016180.
- Vogelsang M. DNA alterations in Lynch syndrome. Dordrecht: Springer 2013.

3. Bonadona V, Bonaiti B, Olschwang S et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* 2011; 305(22): 2304–2310. doi: 10.1001/jama.2011.743.
4. Roberts ME, Jackson SA, Susswein LR et al. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genet Med* 2018; 20(10): 1167–1174. doi: 10.1038/gim.2017.254.
5. Schwartz C, Da Silva EM, Marra A et al. Morphologic and genomic characteristics of breast cancers occurring in individuals with Lynch syndrome. *Clin Cancer Res* 2022; 28(2): 404–413. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-2027.
6. Sheehan M, Heald B, Yanda C et al. Investigating the link between Lynch syndrome and breast cancer. *Eur J Breast Health* 2020; 16(2): 106–109. doi: 10.5152/ejbh.2020.5198.
7. Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3): 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
8. Nikitin AG, Chudakova DA, Enikeev RF et al. Lynch syndrome germline mutations in breast cancer: next generation sequencing case-control study of 1,263 participants. *Front Oncol* 2020; 10: 666. doi: 10.3389/fonc.2020.00666.
9. Mego M, Karaba M, Sedlackova T et al. Circulating tumor cells and breast cancer-specific mutations in primary breast cancer. *Mol Clin Oncol* 2020; 12(6): 565–573. doi: 10.3892/mco.2020.2026.
10. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumor types. *Nature* 2014; 505(7484): 495–501. doi: 10.1038/nature12912.
11. Duraturo F, Liccardo R, De Rosa M et al. Genetics, diagnosis and treatment of Lynch syndrome: old lessons and current challenges. *Oncol Lett* 2019; 17(3): 3048–3054. doi: 10.3892/ol.2019.9945.
12. Strafford JC. Genetic testing for Lynch syndrome, an inherited cancer of the bowel, endometrium, and ovary. *Rev Obstet Gynecol* 2012; 5(1): 42–49.
13. Ramsoekh D, Wagner A, van Leerdam ME et al. Cancer risk in MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers; different risk profiles may influence clinical management. *Hered Cancer Clin Pract* 2009; 7(1): 17. doi: 10.1186/1897-4287-7-17.
14. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med* 2009; 11(1): 35–41. doi: 10.1097/GIM.0b013e31818fa2ff.