

Změny v přístupu k analýze a hodnocení dědičných patogenních variant *TP53*

Changes in the approach to the analysis and evaluation of inherited pathogenic *TP53* variants

Konečná B.¹, Krutílková V.², Kleiblová P.^{1,3}, Macůrek L.⁴, Kleibl Z.^{1,5}

¹ Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze

² Oddělení lékařské genetiky, Laboratoře AGEL a.s., Nový Jičín

³ Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze

⁴ Laboratoř biologie nádorových buněk, Ústav molekulární genetiky AV ČR v.v.i., Praha

⁵ Ústav patologické fyziologie 1. LF UK, Praha

Souhrn

Východiska: Liův-Fraumeniho syndrom (LFS) je vzácné autozomálně dominantní onemocnění charakterizované extrémním celoživotním rizikem vzniku mnohočetných a časně se objevujících zhoubných nádorů, za jehož vznik odpovídají dědičné patogenní mutace v genu *TP53*. Zatímco somatické mutace v *TP53* patří mezi nejčastější genetické alterace u nádorových onemocnění, dědičné mutace jsou raritní. Poslední dekáda přinesla řadu změn v diagnostice LFS a nových poznatků o rizicích asociovaných nádorových onemocnění, které se promítají do preventivních opatření. **Cíl:** Předkládaný přehled ilustruje vývoj diagnostiky LFS a změny v indikačních kritériích pro testování germinálních variant v *TP53*, které umožnily definici širší nozologické jednotky – syndromu dědičné nádorové predispozice související s *TP53* (hTP53rc – heritable TP53-related cancer syndrome). Posun v molekulárně biologické diagnostice směrem k sekvenování nové generace zjednodušil postup a dostupnost vyšetření nádorové predispozice. Analýza genu *TP53* na germinální úrovni se stala součástí vyšetření téměř u všech osob indikovaných k testování dědičné nádorové predispozice, i když se nejedná o osoby s LFS fenotypem. Identifikace skutečných zárodečných patogenních variant *TP53* představuje výzvu v jejich odlišení od mozaicismu či somatických patogenních variant *TP53* vznikajících v důsledku klonální hematopoézy neurčitěho potenciálu. Pro jejich odlišení je nezbytná konfirmační analýza ze vzorku tkáně s vyjádřením alelické frakce variantní alely. Výzvou je i hodnocení patogenity vzácných germinálních variant *TP53*, která vyžaduje komplexní analýzu korelace genotypu s fenotypem. Pro potvrzení patogenity germinálních variant *TP53* byla recentně publikována genově specifická kritéria American College of Medical Genetics and Genomics / Association for Molecular Pathology. Pouze nosiči jednoznačně prokázané zárodečné patogenní varianty by měli být zařazeni do intenzivního klinického preventivního programu. **Závěr:** Předložená práce upozorňuje na posun v poznání a diagnostice jedné z nejsilnějších predispozic ke vzniku nádorových onemocnění a měla by sloužit jako východisko pro další diskuzi týkající se organizace péče o vysoce rizikové nosiče patogenních variant *TP53* nejen v dětském, ale i dospělém věku v ČR.

Klíčová slova

Liův-Fraumeniho syndrom (LFS) – hTP53rc – gen *TP53* – nádorová predispozice – sekvenování nové generace (NGS) – klonální hematopoéza neurčitěho potenciálu (CHIP) – mozaicismus

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 zasílané do biomedicínských časopisů.

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



prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.
Laboratoř onkogenetiky
Ústav lékařské biochemie
a laboratorní diagnostiky
1. LF UK a VFN v Praze
Na Bojišti 1660/3
128 00 Praha
e-mail: zdekbleje@lf1.cuni.cz

Obdrženo/Submitted: 22. 5. 2025

Přijato/Accepted: 15. 6. 2025

doi: 10.48095/ccko2025358

Summary

Background: Li-Fraumeni syndrome (LFS) is a rare autosomal dominant disorder characterized by an extreme lifetime risk of multiple and early-onset tumors, driven by inherited pathogenic variants in the *TP53* gene. While somatic mutations in *TP53* are among the most frequent genetic alterations in cancer, germline mutations remain rare. Although LFS has long been recognized as a prototypical cancer predisposition syndrome, recent advances have significantly reshaped its diagnostic criteria and deepened our understanding of its associated cancer risks. **Objective:** The review illustrates the evolving diagnostic landscape of LFS and the updated indication criteria for germline *TP53* testing, which have broadened the definition of the syndrome into the more inclusive entity of heritable *TP53*-related cancer predisposition syndrome (hTP53rc). The adoption of NGS has streamlined molecular diagnostics in hereditary cancer syndromes. Germline analysis of *TP53* has become standard practice in hereditary cancer predisposition testing, even if a proband does not exhibit a LFS phenotype. However, the accurate identification of germline pathogenic *TP53* variants remains challenging, particularly due to confounding factors, such as mosaicism or clonal hematopoiesis of indeterminate potential. Confirmatory testing using an independent tissue sample, along with estimation of allelic fraction is necessary to distinguish true germline variants. Another major hurdle is the assessment of the pathogenicity of rare germline *TP53* variants, which requires a thorough genotype-phenotype correlation analyses. Recently, gene-specific American College of Medical Genetics and Genomics / Association for Molecular Pathology criteria have been introduced to support the classification of germline *TP53* variants. Importantly, only carriers of a clearly established germline pathogenic variant should be considered for inclusion in an intensive clinical surveillance and prevention program. **Conclusion:** The present work underscores a paradigm shift in the understanding of one of the most significant cancer predisposition syndromes and aims to stimulate further discussion on the organization of care for high-risk carriers of pathogenic *TP53* variants in the Czech Republic.

Key words

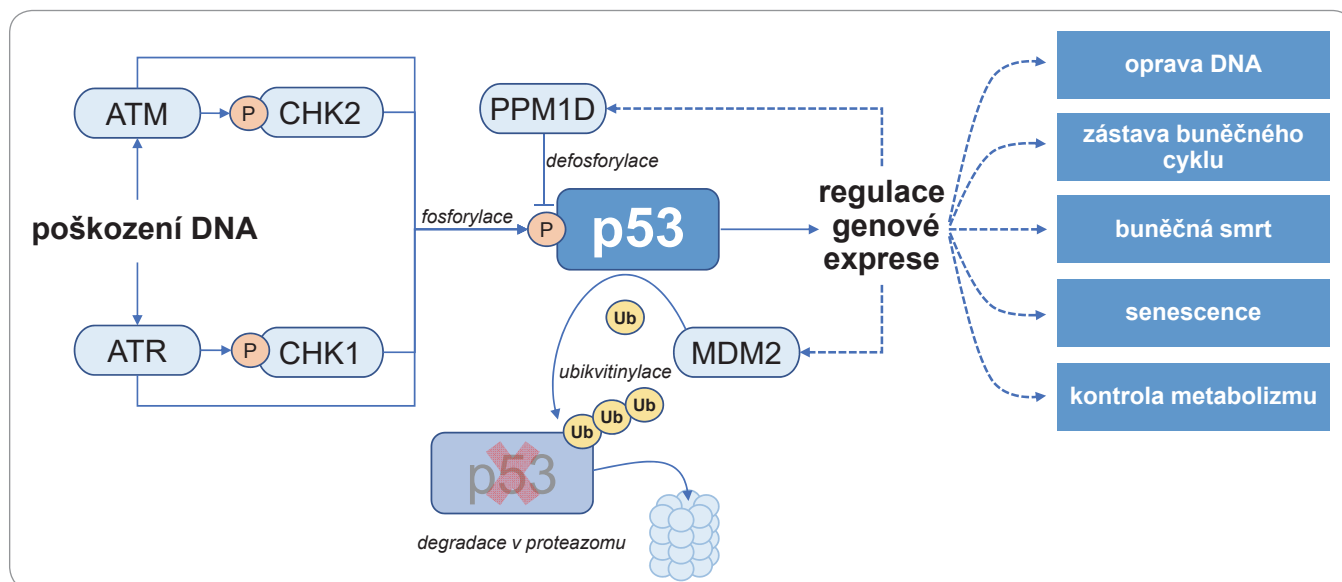
Li-Fraumeni syndrome (LFS) – hTP53rc – *TP53* gene – cancer predisposition – next generation sequencing (NGS) – clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) – mosaicism

Úvod

Liův-Fraumeniho syndrom (LFS) je vzácné autozomálně dominantní onemocnění spojené s extrémním rizikem vzniku časných a nezhoubných mnohočetných zhoubných nádorů. Celoživotní ri-

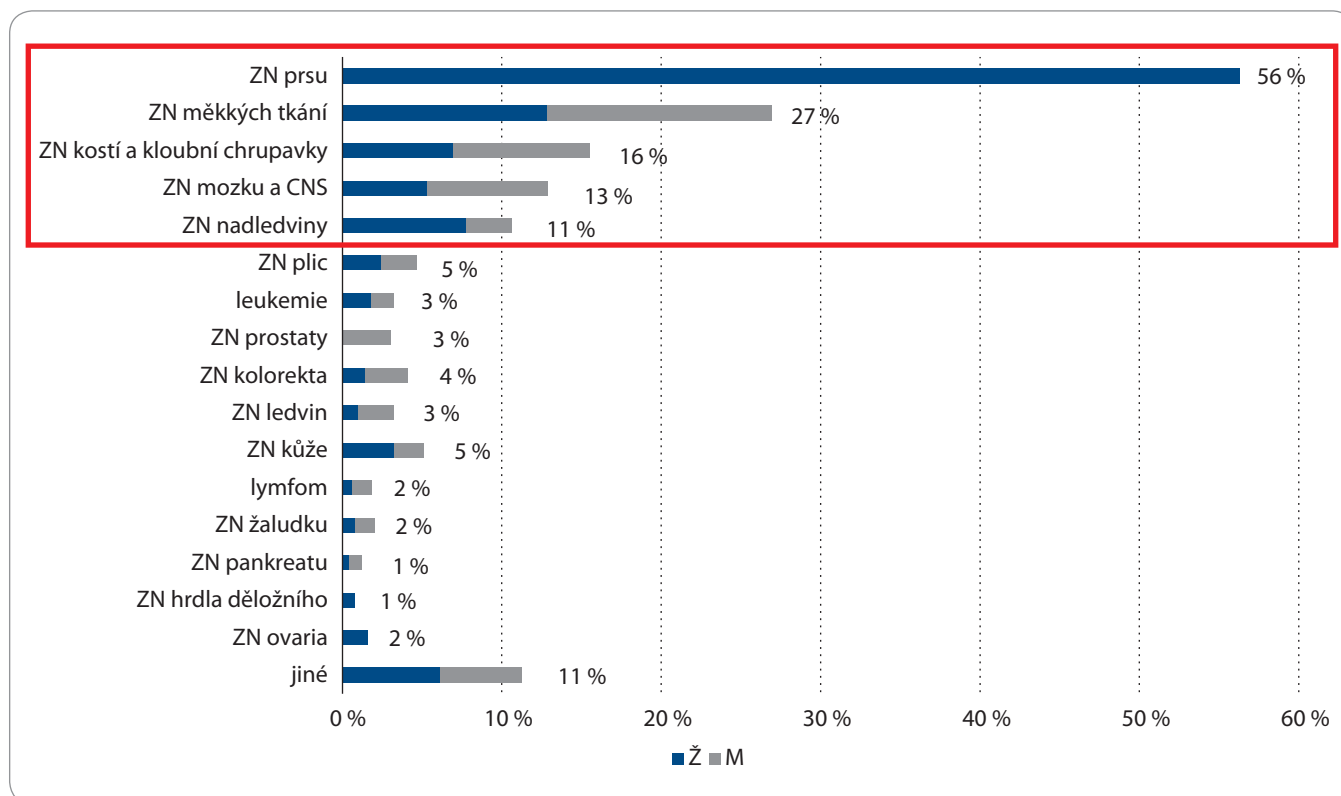
ziko vzniku nádorového onemocnění dosahuje u mužů s LFS 70 % a u žen téměř 100 % [1]. Příčinou LFS jsou germinální patogenní varianty v genu *TP53* kódujícím tumor supresorový protein p53, který je transkripčním faktorem

trvale exprimovaným ve všech buňkách. Do současné doby byly popsány stovky genů, jejichž exprese p53 ovlivňuje, vč. genů řídících řadu důležitých intracelulárních signálních drah kritických ve vztahu k tumorigenezi (obr. 1).



Obr. 1. Význam p53 pro buněčné funkce. Gen *TP53* je za normálních okolností v buňce trvale exprimován. Jeho biologický poločas je však velmi krátký v důsledku degradace p53 proteinu pomocí ubiquitinem (Ub) zprostředkované degradace v proteazomu katalyzované ubiquitinligázou MDM2, jejíž gen transaktivuje p53. Po poškození DNA fosforylují proteinkinázy ATM a ATR p53 přímo nebo prostřednictvím kináz CHK1 a CHK2. Fosforylovaný protein p53 není následně rozpoznáván ubiquitinligázou MDM2 a jeho koncentrace tak rychle narůstá, což umožňuje regulaci exprese genů ovlivňujících uvedené intracelulární dráhy. Na inaktivaci fosforylovaného p53 se podílí fosfatáza PPM1D [41].

ATM – ataxia telangiectasia mutated, ATR – ataxia-telangiectasia-mutated-and-Rad3-related kinase, CHK1 – checkpoint kinase 1, CHK2 – checkpoint kinase 2, MDM2 – mouse double minute 2 homolog (ubiquitin-protein ligase E3), PPM1D – protein phosphatase Mg^{2+}/Mn^{2+} dependent 1D, P – fosforylace, Ub – ubiquitin



Graf 1. Četnost nádorů u nosičů zárodečných mutací v TP53. Typické tumory, charakteristické pro Liův-Fraumeniho syndrom, jsou vyznačeny v červeném rámečku. Karcinom prsu se vyvinul u 56 % nosiček patogenních variant v TP53. Druhým nejčastějším tumorem byl sarkom měkkých tkání s širokým rozsahem věku (6 měsíců až 70 let). Data převzata z [6].

TP53 je nejčastěji postiženým genem ve zhoubných nádorech (ZN). S jeho v naprosté většině somatickými mutacemi se setkáváme u poloviny všech lidských nádorových onemocnění [2]. Oproti tomu jsou zárodečné mutace TP53 způsobující LFS velmi vzácné a v naší populaci nepřesahují četnost 1–3/100 000 [3]. Klasická forma LFS je klinicky definována přítomností typických nádorů, které zahrnují sarkomy měkkých tkání či osteosarkomy (bez Ewingova sarkomu), adrenokortikální karcinomy, tumory CNS a karcinomy prsu u mladých žen. Ke vzniku těchto onkologických onemocnění dochází typicky již v dětském věku či časně dospělosti (u ZN prsu). V souvislosti s LFS se častěji vyskytují také jinak vzácná nádorová onemocnění (hypodiploidní akutní lymfoblastická leukemie nebo tumory chorioidálního plexu) (graf 1).

Zpočátku se analýza genu TP53 prováděla pouze u pacientů splňujících kritéria klasické formy LFS (viz dále). V současnosti je testování TP53 součástí většiny

multigenových panelů pro diagnostiku hereditárních nádorových onemocnění, což umožnilo u nosičů zárodečných patogenních variant v TP53 identifikovat výrazně širší škálu fenotypů (onkologických onemocnění), než které odpovídají klasickým kritériím LFS (graf 1). Variabilita klinických projevů vedla k postupnému rozvolnění diagnostických kritérií a k zavedení širší nozologické jednotky označované jako syndrom dědičné nádorové predispozice související s TP53 (heritable TP53-related cancer syndrome – hTP53rc) [4]. Vlastní LFS je ve skutečnosti podmnožinou hTP53rc tvořenou těmi nosiči patogenních mutací TP53, kteří splňují klasická klinická kritéria LFS. V praxi (a literatuře) se často oba termíny používají promiskuitně.

V minulosti byly s LFS asociovány i zárodečné patogenní varianty v genu CHEK2, avšak postupné doplnění a rozšíření informací o nádorovém spektru u nosičů patogenních variant TP53 a CHEK2 jasně vylučuje, že by varianty v CHEK2 byly spojeny s LFS [5].

V následujícím textu se budeme věnovat významu a interpretaci nálezů patogenních variant v genu TP53 za různých okolností a postupům v interpretaci výsledků molekulárně genetické analýzy, které významně ovlivňují následnou onkologickou péči o vyšetřované osoby.

Diagnostická a indikační kritéria LFS

S ohledem na širokou škálu fenotypů pozorovaných v rodinách s LFS (a nověji u pacientů s hTP53rc) bylo v průběhu let vyvinuto několik různých verzí kritérií k identifikaci osob s LFS a následně nosičů patogenních variant TP53 (tab. 1). LFS byl jako syndrom popsán v roce 1969 [7], ale první, tzv. klasická kritéria LFS, byla představena o více než desetiletí později na základě vyhodnocení klinických charakteristik dostatečného počtu rodin s LFS [8]. Klasická kritéria byla využívána ke stanovení klinické diagnózy LFS bez ohledu na identifikaci patogenní zárodečné mutace TP53. Teprve následně bylo prokázáno, že LFS vzniká

Tab. 1. Přehled diagnostických a indikačních kritérií pro testování pacientů s podezřením na LFS / syndrom dědičné nádorové predispozice související s TP53 (hTP53rc). Mezi nádory typické pro LFS patří sarkom, tumor mozku, adrenokortikální karcinom, karcinom prsu a leukemie.

Klasická kritéria pro diagnostiku LFS [8] (pravděpodobnost záchytu mutace 70–83 %*)

+ RA	osoba se sarkomem ve věku < 45 let + příbuzný 1. stupně s jakýmkoliv nádorem ve věku < 45 let + příbuzný 1. nebo 2. stupně s jakýmkoliv ZN ve věku < 45 let nebo sarkomem v kterémkoliv věku
------	--

Kritéria Birchové [10] (pravděpodobnost záchytu mutace 20–25 %*)

+ RA	osoba s jakýmkoli nádorem dětského věku nebo sarkomem, tumorem mozku nebo adrenokortikálním karcinomem ve věku < 45 let + příbuzný 1. nebo 2. stupně s nádorem typickým pro LFS v jakémkoli věku + příbuzný 1. nebo 2. stupně s jakýmkoli nádorem ve věku < 60 let
------	--

Kritéria Eelesové [11] (pravděpodobnost záchytu mutace 5–8 %*)

+ RA	dva příbuzní 1. nebo 2. stupně s nádorem typickým pro LFS v jakémkoli věku
------	--

Kritéria Chompretové [12] (pravděpodobnost záchytu mutace 20–35 %*)

OA	osoba s adrenokortikálním karcinomem osoba s mnohočetnými nádory, z nichž ≥ 2 jsou typické pro LFS, první ve věku < 36 let
+ RA	osoba se sarkomem, tumorem mozku, karcinomem prsu nebo adrenokortikálním karcinomem ve věku < 36 let + ≥ 1 příbuzný 1. nebo 2. stupně s nádorem typickým pro LFS ve věku < 46 let (pokud má probandka ZN prsu, musí u příbuzných být jiný ZN) NEBO + ≥ 1 příbuzný 1. nebo 2. stupně s vícečetnými ZN typickými pro LFS v jakémkoli věku

Modifikovaná indikační kritéria Chompretové 2008 [13,15] (pravděpodobnost záchytu mutace 29 %*)

OA	osoba s adrenokortikálním karcinomem osoba s mnohočetnými nádory, z nichž ≥ 2 jsou typické pro LFS, první dg. ve věku < 46 let osoba s karcinomem prsu, dg. ve věku < 36 let bez mutace <i>BRCA1</i> nebo <i>BRCA2</i>
+ RA	osoba s nádorem sdruženým s LFS (sarkom měkkých tkání, osteosarkom, tumor mozku, premenopauzální karcinom prsu, adrenokortikální karcinom, leukemie, bronchoalveolární karcinom plic) ve věku < 46 let + ≥ 1 příbuzný 1. nebo 2. stupně s nádorem typickým pro LFS ve věku < 56 let (pokud má probandka ZN prsu, musí u příbuzných být jiný ZN) nebo + ≥ 1 příbuzný 1. nebo 2. stupně s multiplicitou nádorů typických pro LFS v jakémkoli věku

Revidovaná kritéria Chompretové 2015 [6]

OA	osoba s adrenokortikálním karcinomem, nádorem choroidálního plexu, embryonálním anaplastickým rhabdomyosarkomem osoba s mnohočetnými nádory (kromě mnohočetných ZN prsu), z nichž ≥ 2 jsou typické pro LFS, první ve věku < 46 let probandka s karcinomem prsu, dg. ve věku < 31 let bez mutace <i>BRCA1</i> nebo <i>BRCA2</i>
+ RA	osoba s nádorem sdruženým s LFS (např. sarkom měkkých tkání, osteosarkom, tumor mozku, premenopauzální karcinom prsu, adrenokortikální karcinom, leukemie, bronchoalveolární karcinom plic), dg. ve věku < 46 let a současně: + ≥ 1 příbuzný 1. nebo 2. stupně s jedním nádorem typickým pro LFS, dg. ve věku < 56 let (jiným než karcinom prsu v případě, že karcinomem prsu onemocněla probandka) nebo s multiplicitou nádorů typických pro LFS v jakémkoli věku

*pravděpodobnost záchytu převzata z [14]

LFS – Liův-Fraumeniho syndrom, OA – osobní anamnéza, RA – rodinná anamnéza, ZN – zhoubný nádor

v důsledku nosičství dědičných patogenních variant genu *TP53* [9]. V polovině 90. let představily Birchová a Eelesová širší kritéria pro identifikaci rodin,

kteří odpovídají diagnóze LFS-like (LFL), jež zahrnuje pacienty nesplňující všechny „klasické“ znaky LFS [10,11]. V roce 2001 zavedli Chompretová et al.

první indikační kritéria pro diagnostiku LFS s cílem zachytit jedince a rodiny se zárodečnými mutacemi *TP53*, kteří nemusí splňovat klasická kritéria, ale přesto

mají vysoké riziko nádorových onemocnění [12]. Na základě robustní analýzy fenotypů nosičů germinálních mutací v *TP53* Bougeardová et al. aktualizovali v roce 2008 kritéria Chompretové. Tato tzv. modifikovaná kritéria Chompretové umožnila lépe identifikovat rodiny s mírnějšími fenotypy [12,13].

Zatím poslední významná revize kritérií Chompretové provedená v roce 2015 zohledňuje pokroky v molekulárně genetické diagnostice s důrazem na genetické testování pro identifikaci jedinců s dědičnou mutací *TP53* bez typické rodinné anamnézy LFS (tedy pacienty s hTP53rc). Tato tzv. revidovaná kritéria Chompretové rozšiřují spektrum nádorů spojených s LFS (vč. dětských nádorů choroidálního plexu) a zahrnují klinická doporučení pro nosiče mutací *TP53* s cílem optimalizovat strategie prevence a časného zachytu nádorových onemocnění [6].

Klasická kritéria se vyznačují vysokou pozitivní prediktivní hodnotou a vysokou specifícností (50–70 % v některých studiích), avšak poměrně nízkou senzitivitou (kolem 40 %) vyplývající ze skutečnosti, že u jedinců s patogenními variantami *TP53* se mohou vyvinout nádorová onemocnění mimo nádory typické pro LFS (obr. 2). Aplikací pouze klasických LFS kritérií je tedy možné minout řadu nosičů patogenních variant. Pozdější kritéria vykazují výrazně nižší specifícnost (kritéria Chompretové 20–35 %), avšak spojením klasických a revidovaných kritérií LFS je možné dosáhnout až 95% zachytnosti patogenních variant v *TP53* [14].

Indikační kritéria pro testování osob se zvýšeným rizikem přítomnosti dědičných variant v *TP53* se mírně odlišují v různých zemích, což odráží vývoj poznání, ale i regionální preference, dostupné zdroje a konsenzus odborníků v rámci národní lékařské komunity. Doporučení pro testování germinálních mutací *TP53* byla v ČR poprvé publikována v roce 2012 [16]. Rozšířená verze indikačních kritérií vyšla v rámci knihy Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi v roce 2022 [17] a aktualizována byla výborem Společnosti lékařské genetiky v roce 2024 (tab. 2). V souladu se současnými mezinárodními doporu-

ručeními lze o nosičství dědičné patogenní varianty v *TP53* uvažovat i u pacientů mladších 46 let, u kterých se vyvine sekundární nádorové onemocnění v místě ozařování primárního ložiska nádoru typického pro diagnózu LFS [4]. Tito pacienti jsou však již dnes v ČR indikováni ke germinálnímu genetickému testování.

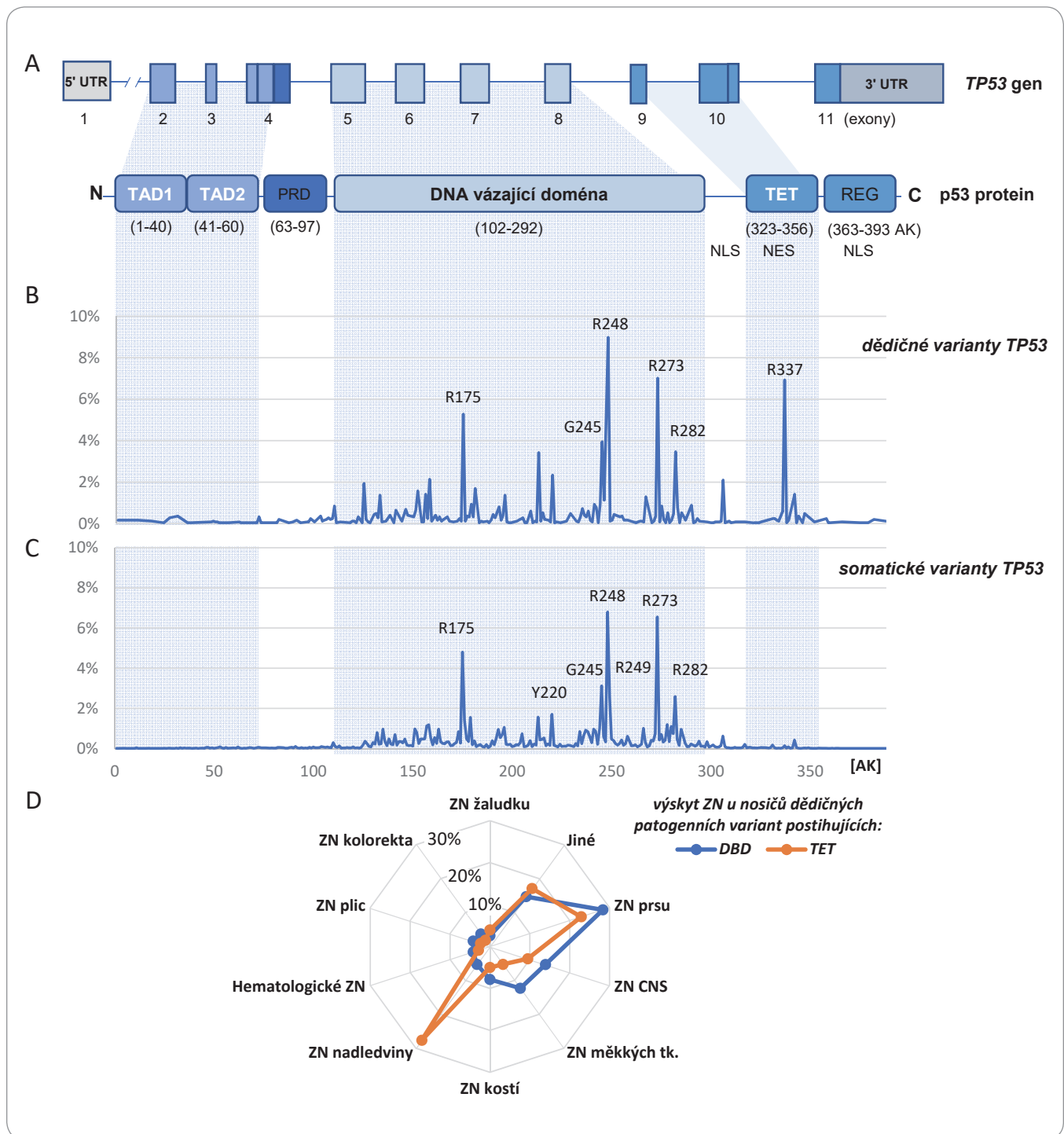
Patogenní varianty v genu *TP53*

Gen *TP53* je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13.1), kde zahrnuje oblast o velikosti ~20 kb (17p13.1). Jeho kanonický transkript (NM_000546.5) obsahuje 11 exonů, z nichž 10 kóduje proteinový produkt p53 o velikosti 393 aminokyselin (obr. 2). Genetické testování zárodečných variant v genu *TP53* lze rozdělit na dvě základní indikace. První je testování přítomnosti dědičné mutace v *TP53* u osoby s typickým nádorovým fenotypem LFS. Druhým, dnes značně častějším případem je zjištění přítomnosti patogenní varianty *TP53* v průběhu genetického testování zárodečné DNA pomocí panelového, celoxomového či celogenomového sekvenování nové generace (next generation sequencing – NGS) u onkologického pacienta či u indikovaného jedince bez onkologického onemocnění.

Klasifikace identifikovaných dědičných variant *TP53* je založena na pětitřídním systému dle American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) / Association for Molecular Pathology (AMP), podobně jako klasifikace germinálních variant v ostatních nádorových predispozičních genech [18,19]. S ohledem na závažnost diagnózy LFS je však hodnocení zárodečných variant specificky uzpůsobeno modifikací obecných doporučení na míru genu *TP53* [20]. Hlavní změny se týkají hodnocení vzácných missense variant, u kterých je pro zařazení mezi patogenní (class 5) nebo pravděpodobně patogenní (class 4) varianty vyžadováno funkční vyšetření pomocí hodnověrných *in vitro* testů. Dosud byly publikovány tři rozsáhlé systematické funkční studie missense variant *TP53* hodnotící transkripční aktivitu [21], ztrátu funkce [22,23] a dominantně negativní účinek variantních izoform p53 [22].

Tradičním zdrojem informací o variantách v *TP53* je *TP53* Database [24], která agreguje publikovaná výzkumná i klinická data od 90. let 20. století (nejprve pod hlavičkou International Agency for Research on Cancer (IARC) a WHO, nyní pod správou National Cancer Institute (NCI)) [25]. Referenčním zdrojem pro klasifikaci germinálních variant způsobujících lidská onemocnění vč. variant v *TP53* ve vztahu k LFS/hTP53rc je databáze ClinVar [26]. K 29. 4. 2025 bylo v databázi ClinVar zařazeno 3 615 různých germinálních variant v genu *TP53*, z nichž více než třetina je klasifikována jako patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianty způsobující ztrátu fyziologické funkce proteinu p53 a jsou považovány za příčinné pro vznik LFS/hTP53rc. Další třetinu tvoří skupina benigních (class 1) a pravděpodobně benigních (class 2) alterací (neutrálních variant bez vztahu k LFS/hTP53rc) a poslední část (kolem 30 % všech) tvoří varianty nejasného významu (variants of uncertain significance – VUS), class 3, u kterých souvislost s onemocněním v současnosti nelze ani prokázat, ani vyloučit. Většinu patogenních (class 4–5) alterací tvoří mutace vedoucí ke vzniku zkráceného proteinu p53 (delece/inzerce, nonsense nebo sestřihové varianty). Pouze pětina (220/1098) ze všech typů reportovaných pravděpodobně patogenních či patogenních variant *TP53* představují missense varianty, avšak tyto se vyskytují zdaleka nejčastěji a jsou přítomné u přibližně 70 % osob s LFS (obr. 2B). Missense varianty tvoří rovněž většinu patogenních alterací v případě somatických mutací (obr. 2C). Spektrum germinálních variant v genu *TP53* je tedy velmi pestré a do značné míry se překrývá se somatickými variantami přítomnými v nádorových buňkách.

Alterace klíčových strukturních aminokyselinových zbytků proteinu p53 v důsledku somatických či dědičných variant jsou patrné jako tzv. hot spot mutace. Ty se kumulují především v oblasti DNA-vázací domény (DBD; obr. 2), kde postihují aminokyseliny zodpovědné za interakci transkripčního faktoru p53 s DNA nebo strukturní integritu DBD. Třebaže jsou hot spot mutace nápadně časté,



Obr. 2. Přehled rozložení patogenních variant v genu *TP53*. (A) Referenční transkript *TP53* (NM_000546.5 obsahuje 11 exonů, z nich 10 je kódujících; kóduje transkripční faktor p53 složený z 393 aminokyselin. Protein p53 obsahuje několik funkčních domén: TAD1/2 slouží pro interakci s transkripčním aparátem, DNA vázající doména (DBD) umožňuje specifickou interakci s DNA v oblasti promotorů genů regulovaných p53, TET doména zprostředkovává vznik transkripčně aktivního tetramerního komplexu p53. Germinální (B) a somatické (C) patogenní varianty postihují nejčastěji aminokyselinové zbytky v DBD. Na ose y je zobrazena frekvence mutací (uvedeny jsou patogenní varianty s frekvencí > 2 %) z údajů získaných od 2 358 nosičů dědičných variant a 27 847 onkologických pacientů se somatickými variantami z *TP53* Database [24]. (D) Četnost výskytu onkologických diagnóz u nosičů dědičných patogenních a pravděpodobně patogenních variant v genu *TP53* postihujících oblast DBD a TET. Prevalence výskytu variant v ostatních částech je nízká a neumožňuje systematické hodnocení.

NES – nukleární exportní signál, NLS – nukleární lokalizační signál, PRD – oblast bohatá na prolin, REG – regulační doména, TAD – trans-aktivační doména, TET – tetramerizační doména, ZN – zhoubný nádor

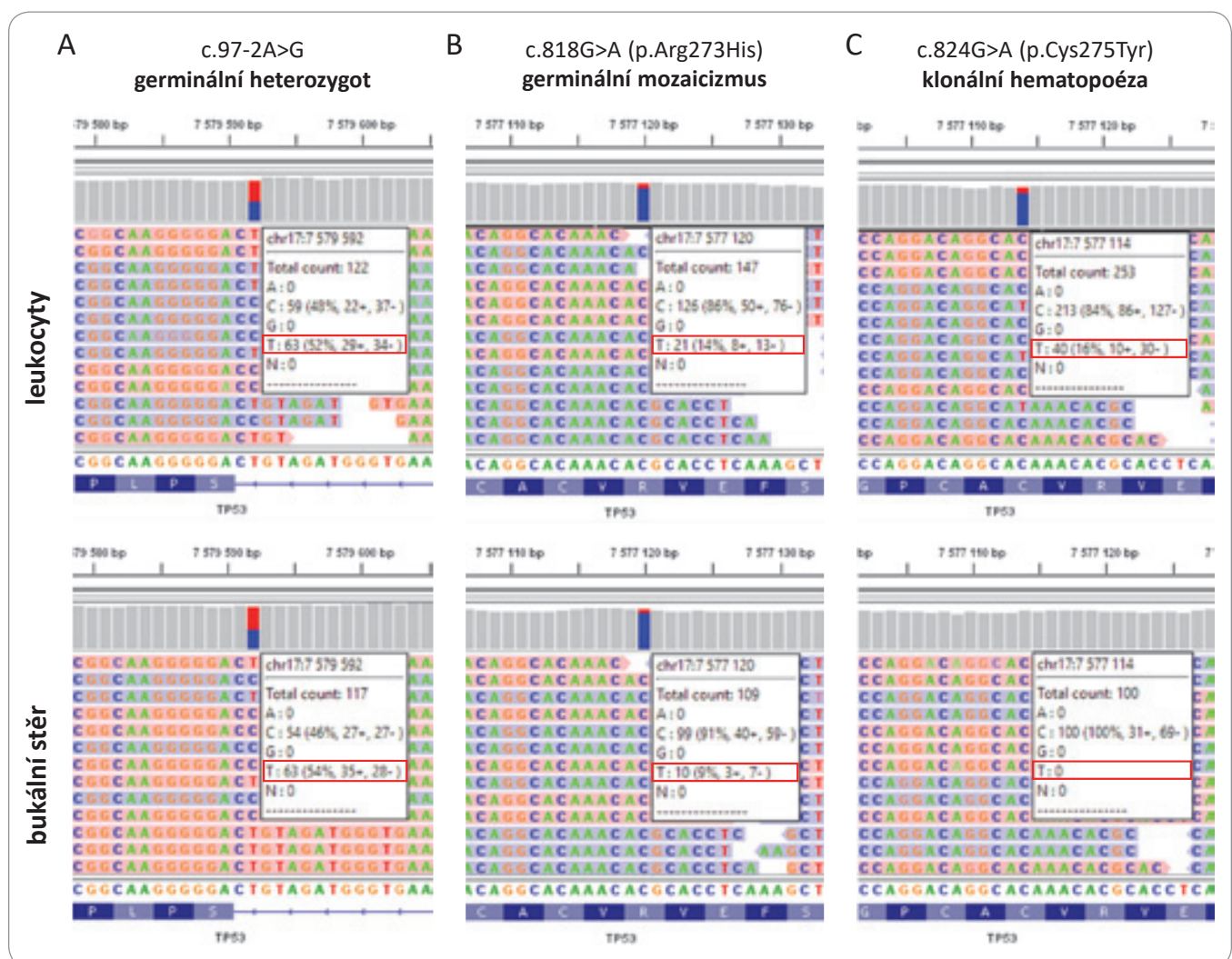
Tab. 2. Současné platná indikační kritéria pro testování s podezřením na LFS v ČR, schváleno výborem SLG ČLS JEP 9. 10. 2024.**SLG ČLS JEP 2024**

- každý ZN kůry nadledvin nebo plexus chorioideus
- 2× tumor spojený s LFS (≥ 1 ve věku < 45 let): sarkom, ZN prsu, ZN nadledvin, leukemie, ZN plic nebo ZN CNS (krom meningeomů)
- příbuzný nosiče patogenní/pravděpodobně patogenní varianty *TP53*

rodinná anamnéza: pacient(ka) s 1 tumorem spojeným s LFS+ příbuzný s tumorem LFS (< 55 let)

+ příbuzný s mnohočetnými tumory LFS

LFS – Liův-Fraumeniho syndrom, SLG ČLS JEP – Společnost lékařské genetiky a genomiky, Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, ZN – zhoubný nádor

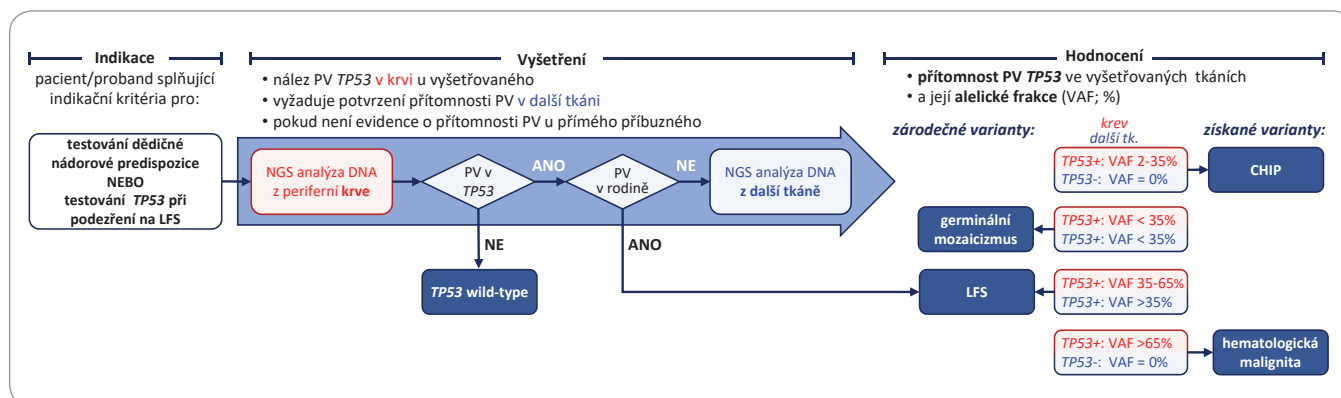


Obr. 3. Detekce různého podílu variantní frakce. Zleva: 52 %, 14 %, 16 % (označeno červeným rámečkem), různých patogenních *TP53* variant zachycených při analýze dědičných mutací pomocí sekvenování nové generace (panel CZEKANCA) z leukocytů periferní krve (nahore) a z konfirmačního odběru nehematopoetické tkáně (dole). Zobrazené případy ilustrují přítomnost skutečné heterozygotní dědičné mutace (A), mozaiky (B) a klonální hematopoézy (C).

tvoří dohromady přibližně pouze třetinu ze všech patogenních variant. Přítomnost dědičných mutací postihujících

DBD je při srovnání proti patogenním variantám lokalizovaným mimo tuto doménu spojena s vyšší penetrancí, nižší

věkem vzniku nádorového onemocnění a vyšším stupněm malignity [6]. Nejčastější missense zárodečná mutace mimo



Obr. 4. Algoritmus postupu vyhodnocení nálezu přítomnosti patogenní varianty TP53 při testování multigenovým panelem.

CHIP – klonální hematopoéza neurčitelného potenciálu, LFS – Liův-Fraumeniho syndrom, NGS – sekvenování nové generace, PV – patogenní varianta, VAF – variantní alelická frakce

DBD je populačně specifická „brazilská“ hypomorfni (pouze částečně nefunkční) varianta p.R337H [27]. Nosiči této varianty mají poněkud odlišné spektrum asociovaných zhoubných nádorů s vysokým rizikem vzniku adrenokortikálních tumorů (obr. 2D), ale výrazně méně často dalších typických nádorů pro LFS. Ženy nosičky p.R337H mají přibližně 90% celoživotní riziko karcinomu prsu, ale významně nižší výskyt onemocnění v mladém věku. Uvádí se, že u méně než 20 % pacientů s p.R337H se vyvine onkologické onemocnění ve věku do 30 let, zatímco u nosičů ostatních patogenních TP53 variant je to kolem 50 % [28–30].

Některé z izoforem missense variant vykazují dominantně negativní účinek, kdy vznikající mutované formy tetramerních p53 proteinů mohou transkripčně aktivovat i zcela jiné geny než wild-type p53 [29,31,32]. Důkazy o dominantně negativním působení dědičných patogenních variant (např. R175H, R246S a R270H) pocházejí však především z *in vitro* nebo *in vivo* experimentů na zvířecích modelech a jejich význam s ohledem na osoby s LFS není klinicky zcela zřejmý [33].

V naší populaci bylo popsáno celé spektrum patogenních variant TP53 vč. delecí celého genu [34], proto je pro vyloučení patogenních variant v TP53 žádoucí věnovat pozornost i strukturním přestavbám (CNV). Nejčastější dědičné mutace TP53 kopírují rozložení uvedené v obr. 2B, hypomorfni varianta p.R337H se však v ČR nativně nevyskytuje.

Úskalí interpretace nálezů zárodečných patogenních variant v TP53

Identifikace a následná interpretace vzácných genetických alterací TP53 vyžaduje komplexní přístup zahrnující hodnocení genetické (výskyt variant v různých populacích a populačních databázích, segregace varianty s onemocněním v postižených rodinách), molekulárně biologické (funkční *in vitro* analýzy), patologické (identifikace ztráty funkční alely v nádorech u nosičů) a klinické (asociace se vznikem typických/atypických onkologických diagnóz a jejich subtypů) [20]. Komplikaci v diagnostice germinálních patogenních variant v TP53 představuje především klonální hematopoéza neurčitelného potenciálu (clonal hematopoiesis of indeterminate potential – CHIP), tj. klonální expanze leukocytů z prekurzorových buněk kostní dřeně, které v průběhu života vyvinuly somatickou mutaci TP53. S ohledem na obrovská rizika vzniku zhoubných nádorů u nosičů zárodečných mutací v TP53 a s tím spojený intenzivní klinický management je nezbytné, abychom v rámci diagnostiky správně určili, zda se v případě přítomnosti patogenní varianty při vyšetření z krve jedná o skutečnou zárodečnou patogenní variantu v heterozygotním stavu, nebo mozaiku, případně zda se u vyšetřovaného variantu v TP53 vyskytuje v důsledku CHIP. Gen TP53 patří mezi pětici nejčastěji postižených genů asociovaných s výskytem CHIP [35]. Odhaduje se, že až 20 % komerčních labo-

ratorních zpráv v USA referujících přítomnost dědičné patogenní varianty v TP53 ve skutečnosti představuje nejspíše CHIP, a nikoliv skutečný záchyt zárodečné mutace [36].

Heterozygotní germinální patogenní varianta by měla být přítomna ve všech somatických buňkách (s výjimkou patologických nádorových buněk) s konzistentní frakcí variantní alely blízkou 50 % (obr. 3). Je tedy vždy nezbytné, aby genetická zpráva o zachycení dědičné mutace TP53 byla doplněna údajem o alelické frakci variantní alely v primárně vyšetřovaném vzorku (obvykle krvi). Nicméně ani 50 % zastoupení variantní alely ve vzorku krve nevylučuje přítomnost CHIP. Pro potvrzení skutečného zárodečného původu je zároveň nutné potvrzení přítomnosti patogenní varianty v alternativní tkáni buněk nehematopoetického původu, např. z bukalní sliznice nebo optimálně z vlasových folikulů (obr. 4), opět se stanovením její alelické frakce. Vyšetření z bukalního stěru je však méně vhodné z důvodu možné kontaminace leukocyty. Alternativou potvrzení dědičného původu je prokázání přítomnosti stejné příčinné mutace u biologického příbuzného. Zde je přitom nezbytné vzít v úvahu, že patogenní varianta TP53 může vzniknout u některých (~10 %) pacientů s LFS *de novo* v rámci gametogeneze [37]. Nízká frakce variantní alely TP53 (< 30 %) v primárním vzorku i ve vzorku další analyzované tkáně značí přítomnost vzácného postzygotického mozaicismu, kdy mutace v genu TP53 vzniká v některé z buněk

blastomery v rámci časné embryogeneze (obr. 3B). Při výskytu CHIP (obr. 3C) je obvyklá přítomnost alterace *TP53* při analýze zárodečné DNA ze vzorku krve, která není detekovatelná při analýze další tkáně. Pravděpodobnost CHIP výrazně stoupá u osob starších 50 let nebo u osob po systémové chemoterapii [38]. U jedinců starších 65 let lze CHIP detekovat v 10 % všech případech analýzy germinální DNA z krve [39].

Přítomnost dědičné patogenní varianty indikuje rovněž konkordantní klinický nález, ve kterém by měly dominovat klasické tumory asociované s LFS. Komplikací je identifikace zárodečné patogenní varianty u osoby bez známé rodinné anamnézy (např. cizinci, osvojené osoby apod.), kde se v rámci hTP53rc může vyskytnout v podstatě libovolná onkologická diagnóza, i když pravděpodobnost nosičství příčinné patogenní varianty významně klesá s věkem (a po 60. roce věku je nepravděpodobná). Všechny osoby s prokázanou dědičnou patogenní variantou v genu *TP53* jsou indikovány k intenzivnímu klinickému sledování a kaskádové analýze mutace u přímých příbuzných bez ohledu na pohlaví a věk (vč. dětí).

V případě potvrzeného mozaicismu *TP53* je doporučeno klinické sledování jako u osob s diagnózou LFS, včetně prediktivního testování potomků nosiče.

Jak bylo uvedeno výše, přítomnost CHIP se zvyšuje v souvislosti s rostoucím věkem. Na eventualitu CHIP je dobré myslet vždy, když je detekována jasná patogenní varianta v *TP53* (vč. hot spot mutací) bez uvedení variantní alelické frakce, především u starší dospělé osoby bez zjevného onkologického onemocnění a/nebo bez nápadné rodinné onkologické anamnézy. U osob s prokázaným CHIP zatím nejsou klinická doporučení pro sledování jasně stanovena, neboť rizika rozvoje hematologických malignit (nejčastěji myeloidního, ale i lymfoidního původu) či asociovaných nehematologických onemocnění (ICHS, diabetu mellitu 2. typu) nebyla doposud vyčíslena. Studie z Mayo Clinic doporučuje retestování CHIP u osob s přetrvávající (≥ 4 měsíce) nevysvětlitelnou cytopenií, u pacientů s malignitami před adjuvantní cytotoxickou chemoterapií

a/nebo radiační léčbou, před autologní transplantací krevetvorných kmenových buněk a CAR-T terapií [40].

Závěr

Interpretace genetického nálezu je v případě genu *TP53* při vyšetření zárodečné DNA specifickým problémem vyžadujícím pečlivý přístup pro vyhodnocení klinického významu nalezené varianty i dodržení doporučeného postupu, vč. konfirmačního vyšetření z nezávislého vzorku nehematopoetické tkáně (obr. 4) pro identifikaci germinální podstaty varianty a jejího odlišení od mozaicismu nebo CHIP. Vysoká penetrance germinálních patogenních variant tumor supresorového genu *TP53* zdůrazňuje jeho význam v onkogenezi a odůvodňuje smysl intenzivních preventivních opatření, která jsou nezbytnou podmínkou zlepšení prognózy u nosičů – pacientů s LFS nebo hTP53rc. Na druhou stranu, vysoká intenzita prevence (zaměřené na časnou detekci nádorů prakticky v libovolné lokalizaci) vyžaduje, aby do sledovacích programů byli zařazeni pouze nosiči skutečných prokázaných zárodečných patogenních/pravděpodobně patogenních variant (class 4 a 5) v *TP53*, a nikoliv nosiči dědičných variant nejasného významu (class 3), nepatogenních variant (class 1 a 2) nebo nosiči patogenních nezárodečných variant v důsledku CHIP.

Předkládaný text si klade za cíl vyvolat širší diskuzi na téma správné identifikace osob s LFS nebo hTP53rc, a tím i následné péče o ně v ČR. Zatímco péče o dětské pacienty se soustřeďuje především ve FN Motol, péče o dospělé nosiče mutací, vč. těch, u kterých byla identifikována patogenní varianta v *TP53* v průběhu panelového vyšetření jako (v podstatě) vedlejší nález, v současnosti centralizována v ČR není. Na širší odborné diskuzi ponecháváme možnost zřízení centralizované péče o dospělé pacienty s LFS/hTP53rc a rovněž její konsenzuální aktualizaci napříč zainteresovanými zdravotnickými odbornostmi.

Podporující agentury a sponzoři: Tato práce byla podpořena Agenturou pro zdravotnický výzkum Ministerstva zdravotnictví ČR (NU22-03-00276 a DR-VFN-64165); Grantovou agenturou Karlovy Univerzity (SVV 260631, Cooperatio a UNCE 24/MED/022).

Literatura

1. Chompret A. The Li-Fraumeni syndrome. *Biochimie* 2002; 84(1): 75–82. doi: 10.1016/S0300-9084(01)01361-X.
2. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(1): a001008. doi: 10.1101/cshperspect.a001008.
3. Tinka P, Pavelka Z, Vejmelková K et al. Extrémně vzácn spinální nádor na podkladě Li-Fraumeni syndromu. *Oncology* 2023; 17(5): 304–307. doi: 10.36290/onc.2023.056.
4. Frebourg T, Lagercrantz SB, Oliveira C et al. Guidelines for the Li-Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes. *Eur J Hum Genet* 2020; 28(10): 1379–1386. doi: 10.1038/s41431-020-0638-4.
5. Fortuno C, Richardson M, Pesaran T et al. CHEK2 is not a Li-Fraumeni syndrome gene: time to update public resources. *J Med Genet* 2020; 60(12): 1215–1217. doi: 10.1136/jmg.2023.109464.
6. Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM et al. Revisiting Li-Fraumeni syndrome from TP53 mutation carriers. *J Clin Oncol* 2015; 33(21): 2345–2352. doi: 10.1200/JCO.2014.59.5728.
7. Li FP, Fraumeni JF. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969; 71(4): 747–752. doi: 10.7326/0003-4819-71-4-747.
8. Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 1988; 48(18): 5358–5362.
9. Malkin D, Li FP, Strong LC et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250(4985): 1233–1238. doi: 10.1126/science.1978757.
10. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 1994; 54(5): 1298–1304.
11. Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* 1995; 25: 101–124.
12. Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet* 2001; 38(1): 43–47. doi: 10.1136/jmg.38.1.43.
13. Bougeard G, Sesboué R, Baert-Desurmont S et al. Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. *J Med Genet* 2008; 45(8): 535–538. doi: 10.1136/jmg.2008.057570.
14. Daly MB, Pal T, Maxwell KN et al. NCCN Guidelines Insights: genetic/familial high-risk assessment: breast, ovarian, and pancreatic, version 2.2024. *J Natl Compr Canc Netw* 2023; 21(10): 1000–1010. doi: 10.6004/jnccn.2023.0051.
15. Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li-Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol* 2009; 27(26): e108–e109. doi: 10.1200/JCO.2009.22.7967.
16. Foretová L, Štěrbá J, Opletal P et al. Li-Fraumeni syndrome – a proposal of complex prevention care for carriers of TP53 mutation with total-body MRI. *Klin Onkol* 2012; 25 (Suppl): S49–S54.
17. Foretová L, Macháčková E, Gaillyová R et al. Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi. Praha: Grada 2022.
18. Richards S, Aziz N, Bale S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17(5): 405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30.
19. Janatová M, Chvojka Š, Macháčková E et al. Classification of germline variants identified in cancer predisposition genetic testing – consensus of the CZE-CANCA consortium. *Klin Onkol* 2023; 36(6): 431–439. doi: 10.48095/ccko2023431.

20. Fortuno C, Lee K, Olivier M et al. Specifications of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for germline TP53 variants. *Human Mutation* 2021; 42(3): 223–236. doi: 10.1002/humu.24152.
21. Kato S, Han SY, Liu W et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(14): 8424–8429. doi: 10.1073/pnas.1431692100.
22. Giacomelli AO, Yang X, Lintner RE et al. Mutational processes shape the landscape of TP53 mutations in human cancer. *Nat Genet* 2018; 50(10): 1381–1387. doi: 10.1038/s41588-018-0204-y.
23. Kotler E, Shani O, Goldfeld G et al. A systematic p53 mutation library links differential functional impact to cancer mutation pattern and evolutionary conservation. *Mol Cell* 2018; 71(1): 178–190.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.012.
24. The TP 53 database. [online]. Available from: <https://TP53.cancer.gov/>.
25. de Andrade KC, Lee EE, Tookmanian EM et al. The TP53 database: transition from the International Agency for Research on Cancer to the US National Cancer Institute. *Cell Death Differ* 2022; 29(5): 1071–1073. doi: 10.1038/s41418-022-00976-3.
26. ClinVar Database. [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
27. Šmardová K, Koptíková J. Brazilian story of the R337H p53 mutation. *Klin Onkol* 2014; 27(4): 247–254. doi: 10.14735/amko2014247.
28. Andrade KC, Santiago KM, Fortes FP et al. Early-onset breast cancer patients in the South and Southeast of Brazil should be tested for the TP53 p.R337H mutation. *Genet Mol Biol* 2016; 39(2): 199–202. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2014-0343.
29. Amadou A, Achatz MIW, Hainaut P. Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome. *Curr Opin Oncol* 2018; 30(1): 23–29. doi: 10.1097/CCO.0000000000000423.
30. Robles AI, Harris CC. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(3): a001016. doi: 10.1101/cshperspect.a001016.
31. Weisz L, Oren M, Rotter V. Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene* 2007; 26(15): 2202–2211. doi: 10.1038/sj.onc.1210294.
32. Monti P, Perfumo C, Bisio A et al. Dominant-negative features of mutant TP53 in germline carriers have limited impact on cancer outcomes. *Mol Cancer Res* 2011; 9(3): 271–279. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0496.
33. Gencel-Augusto J, Lozano G. p53 tetramerization: at the center of the dominant-negative effect of mutant p53. *Genes Dev* 2020; 34(17–18): 1128–1146. doi: 10.1101/gad.340976.120.
34. Foretová L, Sedláček Z, Křepelová A et al. Syndrom Li-Fraumeni – diagnostické a preventivní možnosti. Kazuistika pacientky s delecí celého genu TP53. 2010 [online]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/database-tuzemskych-onkologickych-konferenc-nich-abstrakt/syndrom-li-fraumeni-diagnosticke-a-preventivni-moznosti-kazuistika-pacientky-s-d/>.
35. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 2015; 126(1): 9–16. doi: 10.1182/blood-2015-03-631747.
36. Weitzel JN, Chao EC, Nehoray B et al. Somatic TP53 variants frequently confound germ-line testing results. *Genet Med* 2018; 20(8): 809–816. doi: 10.1038/gim.2017.196.
37. Renaux-Petel M, Charbonnier F, Théry JC et al. Contribution of de novo and mosaic TP53 mutations to Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet* 2018; 55(3): 173–180. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104976.
38. Prochazkova K, Pavlikova K, Minarik M et al. Somatic TP53 mutation mosaicism in a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Am J Med Genet A* 2009; 149A(2): 206–211. doi: 10.1002/ajmg.a.32574.
39. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 2014; 371(26): 2477–2487. doi: 10.1056/NEJMoa1409405.
40. Mangaonkar AA, Patnaik MM. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and clonal cytopenias of undetermined significance: 2023 update on clinical associations and management recommendations. *Am J Hematol* 2023; 98(6): 951–964. doi: 10.1002/ajh.26915.
41. Pecháčková S, Burdová K, Macůrek L. WIP1 phosphatases as pharmacological target in cancer therapy. [online]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-017-1536-2>.