Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie

Mgr. Ivana Tichá

GENETICKÉ FAKTORY ODPOVĚDNÉ ZA VÝVOJ DĚDIČNÉHO KARCINOMU PRSU A OVARIA

ROZSÁHLÉ PŘESTAVBY V GENECH *BRCA1* A *BRCA2*

GENETIC FACTORS RESPONSIBLE FOR HEREDITARY BREAST AND OVARIAN CANCER DEVELOPMENT

LARGE REARRANGEMENTS IN *BRCA1* AND *BRCA2* GENES

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce: Doc. MUDr. Petr Pohlreich, CSc.

Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK v Praze

Praha, 2010

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům, za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (http://repozitar.cuni.cz). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze

Souhlasím – ~~Nesouhlasím~~*****

V Praze, 2.9.2010 IVANA TICHÁ

*** Nehodící se škrtněte**

Identifikační záznam:

TICHÁ, Ivana. *Genetické faktory odpovědné za vývoj karcinomu prsu a ovaria. Rozsáhlé přestavby v genech BRCA1 A BRCA2* [*Genetic Factors Responsible for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Development. Large Rearrangements in BRCA1 and BRCA2 Genes*] Praha, 2010. 94 str., 2 příl. Dizertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biochemie a experimentální onkologie. Vedoucí práce: Doc. MUDr. Petr Pohlreich, CSc.

Abstrakt:
Úvod: Vývoj dědičného karcinomu prsu/ovaria podmiňují zárodečné mutace řady genů. V této studii byly analyzovány rozsáhlé přestavby genů *BRCA1/2* a dále jsme se zaměřili na úlohu genů *CHEK2* a *TP53* v tumorogenezi. M**etody:** U 586 vysoce rizikových pacientů s karcinomem prsu/ovaria, u kterých nebyly standardní analýzou prokázány mutace v genech *BRCA1/2*, byly přestavby analyzovány pomocí MLPA, long range PCR a sekvenování; dlouhé delece přesahující hranice genu byly lokalizovány pomocí oligonukleotidové aCGH specifické pro lidský chromosom 17. MLPA analýza byla rovněž použita k detekci dvou často se vyskytujících mutací genu *CHEK2* (c.1100delC a delece 5395 bp). K analýze kódující oblasti genu *TP53* bylo použito sekvenování. **Výsledky:** Detekovali jsme 9 různých přestaveb genu *BRCA1* u 16 pacientů. Pět z nich (delece exonů 1-17, 5-10, 13-19, 18-22 a 21-24) nebylo dosud popsáno. Delece exonů 1-17, 5-14 a 21-22 byly detekovány opakovaně a představují populačně specifické (founder) mutace. Dlouhé delece a přestavby představovaly 12,1% (16/132) všech detekovaných patogenních mutací genu *BRCA1*. V genu *BRCA2* žádná rozsáhlá přestavba nalezena nebyla. Výskyt patogenních mutací v dalších testovaných genech byl nižší; 2 mutace byly detekovány v genu *TP53* a 9 v genu *CHEK2*. **Závěr:** Přestavby představují v naší populaci významnou část mutací genu *BRCA1*. Jejich analýza je dle našich výsledků indikována nejen u pacientek s rodinnou zátěží, ale i u sporadických případů onemocnění, především u pacientek s časným karcinomem prsu. Jako významné se rovněž jeví testování mutací genu *CHEK2*, které se specificky vyskytují v naší populaci; analýza genu *TP53* může být omezena na případy karcinomu prsu ve velmi nízkém věku (do 30 let).

Klíčová slova: karcinom prsu, *BRCA1*, *BRCA2*, rozsáhlé genomové přestavby, MLPA, aCGH, *CHEK2*, *TP53*

Summary:

Background: A greatly increased risk for development of hereditary breast cancer is associated with germline mutations in several susceptibility genes. In this study we analyzed large genomic rearrangements (LGRs) in *BRCA1/2* genes and we also focused on the role of *CHEK2* and *TP53* in tumorigenesis. **Methods:** A series of 586 high risk patients with breast/ovarian cancer that had previously been tested negatively for small mutations in *BRCA1/2* was screened for LGRs by MLPA, LR-PCR and sequencing. Chromosome 17-specific aCGH was used to locate deletion breakpoints in regions flanking the *BRCA1* gene. MLPA-analysis was also used to detect two frequently occurring mutations in *CHEK2* (c.1100delC and a deletion of 5395 bp). The coding region of the *TP53* gene was analyzed by sequencing. **Results:** We identified 9 different LGRs in the *BRCA1* gene in 16 patients. Five alterations (deletion of exons 1-17, 5-10, 13-19, 18-22 and 21-24) were novel. Deletions of exons 1-17, 5-14 and 21-22 were identified repeatedly, and represented population specific (founder) mutations. LGRs accounted for 12.1% (16/132) of all detected pathogenic *BRCA1* mutations. No LGRs were found in the *BRCA2* gene. Pathogenic mutations in other tested genes were less frequent; 2 were detected in *TP53* and 9 in *CHEK2*. **Conclusions:** In our population, LGRs represent substantial proportion of pathogenic mutations in *BRCA1*. Our results indicate that screening for LGRs in *BRCA1* should include patiens from high-risk families as well as patients with non-familial cancer; in particular cases with early-onset breast cancer. Testing of *CHEK2* for the two recurrent mutations seems to be also relevant in our population; analysis of *TP53* may be restricted to cases of early onset breast cancer.

Key words: breast cancer, *BRCA1*, *BRCA2*, large genomic rearrangements, MLPA, aCGH, *CHEK2*, *TP53*

OBSAH

OBSAH **1**

TEORETICKÝ ÚVOD **4**

1. Karcinom prsu **4**

1.1 Rizikové faktory 5

1.2 Klasifikace nádorů prsu 5

1.3 Patogeneze karcinomu prsu 7

1.4 Molekulární mechanizmy zajišťující genomovou stabilitu 9

1.4.1 Vysokopenetrantní a nízkopenetrantní geny spojené se vznikem karcinomu prsu a ovaria 10

1.4.1.1 Geny s vysokou penetrancí 10

1.4.1.1.1 Gen a protein BRCA1 10

1.4.1.1.2 Gen a protein BRCA2 12

1.4.1.1.3 Gen *TP53* a protein p53 13

1.4.1.1.4 Geny se střední a nízkou penetrancí 14

1.4.1.1.5 Gen a protein CHEK2 14

1.4.1.1.6 Gen a protein ATM 16

2. Úloha genů *BRCA1* a *BRCA2* u hereditárních nádorů **17**

2.1. Spektrum mutací v České republice u rizikových pacientů s karcinomem prsu nebo ovaria 19

3. Rozsáhlé genomové přestavby **22**

3.1 Rozsáhlé přestavby v genu *BRCA1* a *BRCA2* 23

3.2 Metody detekce rozsáhlých přestaveb 24

3.2.1 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 25

3.2.2 Oligonukleotidová aCGH 28

4. Určení pravděpodobnosti nosičství mutace v genech *BRCA1/2* **29**

PRACOVNÍ HYPOTÉZA A CÍLE STUDIE **30**

MATERIÁL A METODY **31**

1. Pacienti **31**

2. Izolace genetického materiálu **32**

2.1 Izolace DNA z periferní krve 32

2.2 Izolace RNA z periferní krve 32

2.3 Kontrola koncentrace a kvality izolovaného genetického materiálu 32

3. Příprava cDNA **33**

4. Design primérů **33**

5. Mutační analýza genu *TP53* **34**

5.1 Amplifikace genu *TP53* 34

6. Mutační analýza genu *CHEK2* **35**

6.1 Detekce mutace c.1100delC - amplifikace specifického fragmentu DNA 35

6.2 Detekce delece exonů 8-9 36

7. Automatické sekvenování **37**

8. Výpočet pravděpodobnosti nosičství mutace **38**

9. MLPA analýza (Multiplex ligation-dependent probe amplification) **38**

10. Oligonukleotidová aCGH (Oligonucleotide array-based CGH) **39**

11. Identifikace a charakterizace rozsáhlých přestaveb **40**

12. Názvosloví mutací **41**

13. Analýza *BRCA1* haplotypů **42**

VÝSLEDKY **45**

1. Charakteristika vyšetřovaného souboru a frekvence výskytu velkých přestaveb genů *BRCA1* a *BRCA2* **45**

1.1 Určení pravděpodobnosti nosičství mutace pomocí programu BRCAPRO 48

2. Analýza a charakterizace rozsáhlých genomových přestaveb 48
2.1 Detekce rozsáhlých genomových přestaveb 48
2.1.1 MLPA analýza 49
2.1.2 Výběr mikročipu pro aCGH 50
2.2 Charakterizace rozsáhlých přestaveb a určení bodů zlomu 51
2.3 Analýza *BRCA1* haplotypů 58

3. Mutační analýza genu *TP53* 59

4. Mutační analýza genu *CHEK2* 61

DISKUZE 64

1. Analýza rozsáhlých genových přestaveb 64
1.1 Výskyt rozsáhlých přestaveb v genech *BRCA1* a *BRCA2* 64
1.2 Charakterizace rozsáhlých přestaveb 66
1.3 Mechanizmus vzniku rozsáhlých přestaveb 67

2. Úloha genu *TP53* v rodinách s hereditární predispozicí ke karcinomu prsu 67

3. Úloha genu *CHEK2* v rodinách s hereditární predispozicí ke karcinomu prsu 69

ZÁVĚR 72

PODĚKOVÁNÍ 74

SEZNAM ZKRATEK 75

SEZNAM OBRÁZKŮ 78

SEZNAM TABULEK 79

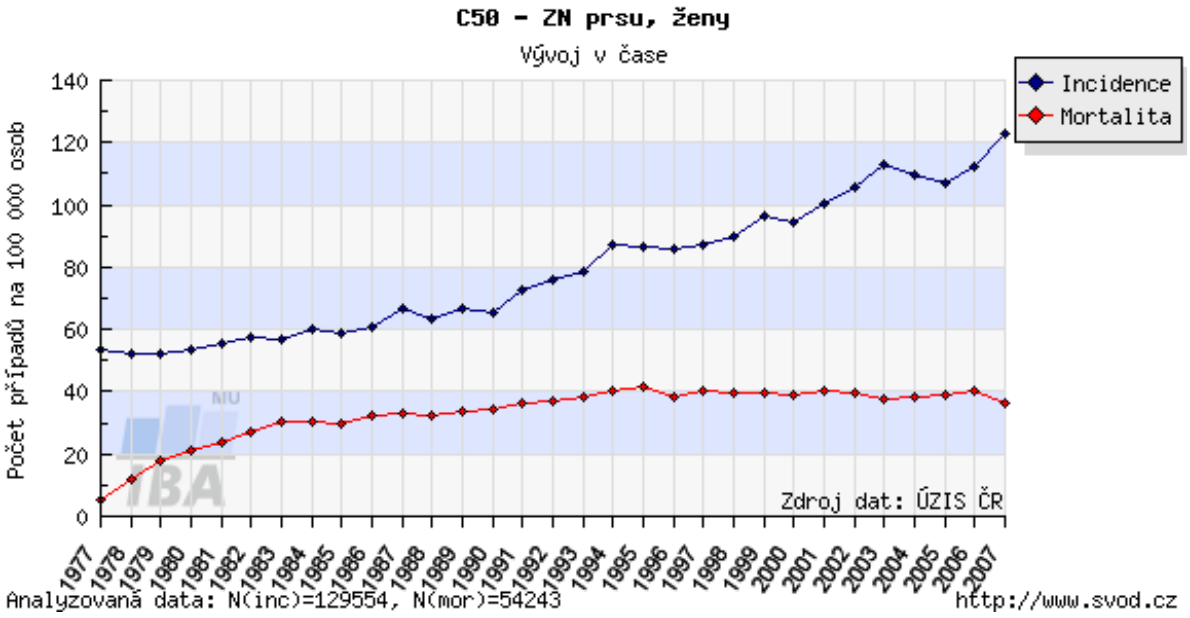
SEZNAM PŘÍLOH 80

POUŽITÁ LITERATURA 81

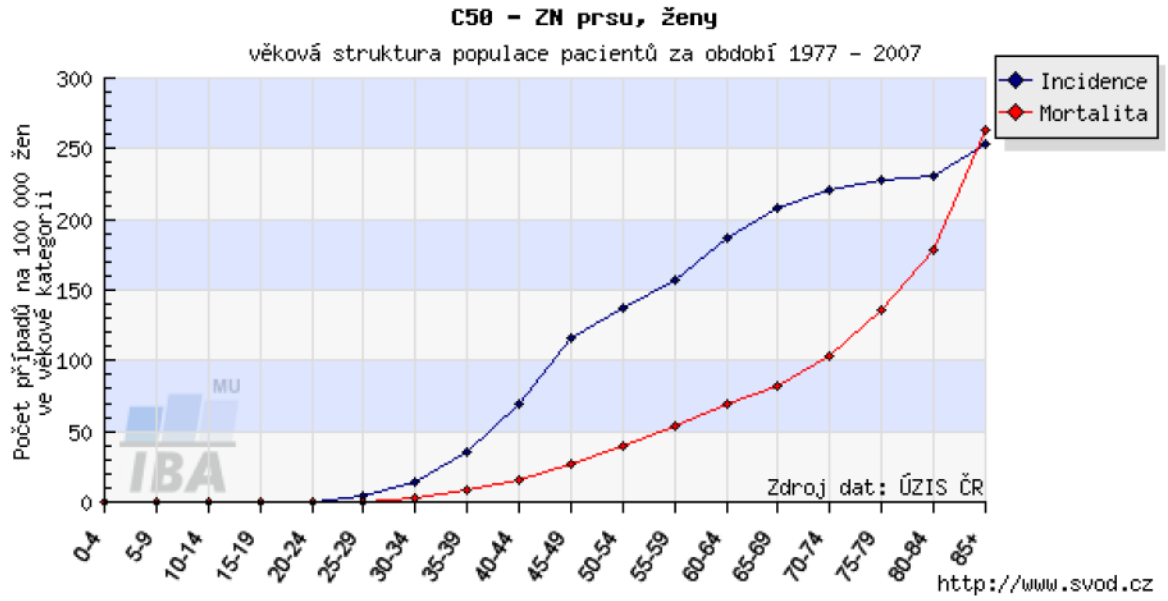
TEORETICKÝ ÚVOD

1. Karcinom prsu

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním u žen v České republice i dalších evropských zemích (není-li brána v úvahu diagnóza C44 – jiný zhoubný novotvar kůže). Jedná se o onemocnění s velmi dlouhou historií; první zmínky o této chorobě pocházejí z doby 3 000 let před Kristem ze staroegyptských papyrů. V roce 2006 bylo v České republice diagnostikováno 5884 nových případů karcinomu prsu, což je téměř 17% všech hlášených onkologických onemocnění u žen (ročenka ÚZIS 2008, ČR, http://www.uzis.cz). Incidence onemocnění u nás, podobně jako v jiných zemích, v dlouhodobém pohledu roste (Obr. 1) a v posledních dvaceti letech se zdvojnásobila. V roce 2006 bylo registrováno 112 případů na 100 000 žen. Za příznivý trend je možné považovat zvyšující se podíl pacientek diagnostikovaných v raném klinickém stádiu nádoru prsu (71,3% ve stádiu I a II), kdy je léčba relativně úspěšná (zhoubné nádory v roce 2006, ÚZIS 2009). Úmrtnost na karcinom prsu se v posledních letech nezvyšuje (Obr. 1), přesto je nejčastější onkologickou příčinou úmrtí u žen. Z obrázku 2 je zřejmé, že počet případů s věkem roste.



Obrázek 1: Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) pro diagnózu karcinomu prsu v celé populaci České republiky. C50- kód diagnózy, zhoubný novotvar prsu; ZN – zhoubný nádor.



Obrázek 2: Počet hlášených případů karcinomu prsu (diagnóza C50) a zemřelých na tuto diagnózu v přepočtu na 100 000 žen v dané věkové kategorii. Incidence se vztahuje k věku v době diagnózy a mortalita k věku úmrtí.

1.1 Rizikové faktory

Karcinom prsu je multifaktoriální onemocnění a jeho zvýšené riziko může mít řadu příčin [1]. Nejzávažnějším rizikovým faktorem je výskyt karcinomu prsu a/nebo ovaria v rodině. Dalšími rizikovými faktory jsou faktory hormonální (dlouhodobé působení estrogenních hormonů na prsní žlázu), nutriční (nadbytek tuků v potravě, obezita), příjem alkoholu, kouření a faktory vnějšího prostředí (radiace).

1.2 Klasifikace nádorů prsu

Nejčastějšími zhoubnými nádory prsu jsou epitelové nádory - karcinomy. Adenokarcinom - nádor ze žlázového epitelu - je nejčastější maligní nádor prsu a může být původu duktálního (spíš 80%), lobulárního (5 -10%) nebo smíšeného (5%). Nádory mezenchymálního původu - sarkomy - jsou velmi vzácné [1].

Karcinomy se dále dělí na neinvazivní (*in situ*) a invazivní (infiltrující). Neinvazivní karcinomy charakterizuje přítomnost maligních epitelových buněk, které nemají schopnost prorůstat bazální membránou a tvořit vzdálené metastázy. Duktální karcinom *in situ*

(DCIS) představuje 80% všech neinvazivních nádorů. V důsledku kalcifikace tkáně je možné ho zachytit mamografií. Až 70% DCIS přechází v invazivní formu onemocnění. DCIS je dále rozdělován do několika subtypů podle převažujícího charakteru růstu nádorových buněk. Ve většině případů se však prolíná více strukturních forem [1].

Lobulární karcinom *in situ* (LCIS) tvoří asi 20% neinvazivních nádorů. V invazivní formu přechází asi 35% případů. LCIS však bývá ve vyšším procentu případů (30-70% oproti 10-30% u DCIS) multifokální a oboustranný. Klinická diagnostika LCIS je prakticky nemožná, neboť nádor nevytváří hmatné útvary, které by mohly být zachyceny fyzikálním nebo mamografickým vyšetřením, a proto je většinou diagnostikován náhodně z excizí provedených v důsledku jiné léze.

Invazivní karcinomy se na základě histologického nálezu dělí na duktální (IDC) a lobulární (ILC) karcinomy. IDC představuje většinu (~80%) invazivních karcinomů prsu. Tyto nádory vytvářejí většinou špatně ohraničená ložiska a prorůstají do okolní tukové tkáně. Výrazně méně častý je ILC, který zahrnuje jen 5-10% nádorů prsu. Vývoj a terapeutické možnosti léčby obou typů nádorů jsou, i přes jejich histologické odlišnosti, téměř identické.

Mezi invazivní karcinomy se řadí i několik dalších typů, jako je medulární karcinom, tubulární karcinom, papilární karcinom a prognosticky příznivý mucinózní karcinom, které ovšem celkově nepředstavují více než asi 5% nádorů. Zastoupení histologických typů karcinomů prsu znázorňuje tabulka 1 [2].

***Tabulka 1**:* Procentuální zastoupení jednotlivých histologických typů karcinomu prsu.

Histologický typ	**Celkem karcinomů (%)**	**z toho (%)**
***In situ* karcinomy**	**15 – 30**	
DCIS		80
LCIS		20
Invazivní karcinomy	**70 – 85**	
IDC		79
ILC		10
medulární karcinom		2
mucinózní karcinom		2
tubulární karcinom		2
papilární karcinom		1

Léčba a prognóza onemocnění se liší podle jeho stádia v době diagnózy. Klinické stádium nádoru je určeno podle standardní TNM klasifikace navržené mezinárodní unií proti rakovině (UICC) [3], která hodnotí rozsah onemocnění. U nádorů menších než 2 cm bez postižení spádových uzlin (stádium I) přežívá 5 let více něž 90% nemocných. U větších nádorů (stádium II) a zejména při postižení uzlin a přítomnosti vzdálených metastáz (stádium III-IV) se prognóza výrazně zhoršuje.

U invazivních karcinomů se dále posuzuje tzv. grading, který je podobně jako stádium nádoru (staging) považován za významný prognostický faktor. Nádory tvořené dobře diferencovanými buňkami (Grade 1) mají lepší prognózu než nádory částečně a špatně diferencované (Grade 2 a 3). Posuzuje se tvorba tubulů (jako indikátor diferenciace žlázy), buněčný a nukleární pleomorfizmus a mitotická aktivita [4]. Grading se určuje u všech typů invazivních karcinomů kromě medulárního.

Mezi další prognostické a prediktivní faktory patří věk pacientky v době onemocnění, exprese hormonálních receptorů v nádorové tkáni a histologický nález.

1.3 Patogeneze karcinomu prsu

Rozlišujeme dvě patogeneticky odlišné formy karcinomu prsu, hereditární, charakterizovaná rodinným výskytem nádorového onemocnění a nehereditární se sporadickým výskytem v populaci. Hereditární případy v této práci dále dělíme na HBOC (hereditary breast and ovarian cancer) – rodiny s hereditárním syndromem karcinomu prsu a ovaria, HBC (hereditary breast cancer) – rodiny s hereditárním syndromem karcinomu prsu a HOC (hereditary ovarian cancer) – rodiny s hereditárním syndromem karcinomu ovaria. Tumorogeneze těchto dvou typů není totožná a u obou forem může probíhat řadou molekulárních mechanizmů [5,6,7]. Soubor genů podílejících se na vzniku karcinomu prsu není zcela znám. Geny s prokázanou úlohou při vývoji karcinomu prsu patří jednak do skupiny tumor supresorových genů, které se často významně uplatňují v DNA reparačních pochodech a jsou nutné pro udržení stability genomu (molekulárnímu mechanizmu zajištění genomové stability je věnována kapitola 1.4, str. 9). Další geny významné v tumorogenezi pak patří do skupiny onkogenů. Onkogeny vznikají z normálních buněčných genů (protoonkogenů) v důsledku mutace nebo zvýšené exprese. Pro aktivaci onkogenu, která je nutná pro úlohu v tumorogenezi,

postačuje modifikace jedné genové kopie protoonkogenu. Proto se onkogeny nazývají dominantní nádorové geny. Tumor supresorové geny naopak ztrácejí svou funkci v případě inaktivace obou alel. Knudsonova teorie dvojího zásahu vysvětluje rozdíl v tumorogenezi u dědičných a sporadických forem nádorů prsu [8]. Jedinci s hereditární formou onemocnění nesou, v důsledku přenosu zárodečnou buňkou, inaktivující mutaci jedné alely genu ve všech buňkách organizmu. Inaktivace druhé alely vzniká spontánně v cílové buňce (somatická mutace) a iniciuje tumorogenezi. Takovým inaktivujícím defektem může být například bodová mutace nebo dlouhá delece postihující funkční alelu, která se projevuje jako ztráta heterozygozity (LOH, loss of heterozygosity). Přítomnost dědičné mutace tedy vytváří predispozici k nádorovému bujení. U nedědičných nádorů musí v buňce dojít k inaktivaci obou alel tumor supresorového genu, což je málo pravděpodobné, a souvisí proto se sporadickým výskytem a pozdějším nástupem onemocnění. Studie Lomana a spol. [9] dokládá, že karcinom prsu u nosičů mutace genu *BRCA1* se vyskytuje častěji v nižším věku, typicky před 40 rokem, ve srovnání s karcinomem sporadickým.

Sporadická forma karcinomu prsu představuje více než 90% případů onemocnění. U sporadických nádorů lze prokázat postižení řady genů a kromě běžných změn v primární sekvenci sehrávají významnou roli i epigenetické změny ovlivňující expresi genu (například hypermetylace promotorových oblastí) [10,11,12], a mutace zasahující do regulačních genových oblastí ovlivňujících transkripci [13,14]. V procesu tumorogeneze jsou rovněž významné faktory prostředí.

Pouze 5-10% případů karcinomu prsu je dědičných a vyvíjí se v důsledku zárodečné mutace odpovědného genu. Byla nalezena řada genů, jež jsou významné v patogenezi hereditárního karcinomu prsu. Alterace v genech *BRCA1* a *BRCA2* jsou odpovědné za přibližně 60-80% případů hereditárního onemocnění a jsou spojeny s vysokým rizikem vývoje karcinomu prsu [15]. Mutace genů *TP53* a *PTEN* spojené se vzácnými nádorovými syndromy – Li-Fraumeniho syndrom (*TP53*) a Cowdenův syndrom (*PTEN*) – rovněž významně zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu. Naproti tomu alterace dalších genů zvýšují riziko karcinomu prsu jen přibližně na dvojnásobek. Mezi tyto středně a nízkopenetrantní geny patří *CHEK2*, *ATM*, *NBS1*, *RAD50*, *BACH1*, *BRIP1* a *PALB2* [15,16,17,18]. Soubor uvedených odpovědných genů není pravděpodobně úplný, protože u mnoha pacientek s rodinným výskytem karcinomu prsu nebyla genová alterace nalezena.

1.4 Molekulární mechanizmy zajišťující genomovou stabilitu

Řada důkazů svědčí o tom, že nestabilita genomu hraje důležitou úlohu v tumorogenezi [19]. Udržení integrity genomu závisí zejména na regulaci buněčného cyklu a na DNA-reparačních pochodech [20]. Propojení regulace buněčného cyklu a reparace DNA pak umožňuje zastavení buněčného cyklu a opravu poškozené DNA ještě před započetím její replikace; případně může před přechodem buňky do S-fáze buněčného cyklu převážit proapoptotická signalizace.

Dvouvláknové zlomy jsou závažným poškozením DNA vznikající účinkem UV záření, radiace či působením chemických látek poškozujících DNA. Buňky pro opravu dvouvláknových zlomů DNA využívají dvě hlavní cesty: homologní rekombinaci, kde je pro opravu zapotřebí identická sekvence (sesterské chromatidy nebo homologního chromozómu), která slouží jako templát pro reparaci zlomu, a nehomologní spojování zlomů (NHEJ, non-homologous end joining), kdy se přímo bez přítomnosti homologního templátu spojí volné konce DNA [21,22,23]. Obě cesty reparace mohou vést ke ztrátě genetické informace. U NHEJ je však tento výsledek více pravděpodobný; naopak homologní rekombinace může zajistit bezchybnou cestu opravy DNA. Dosud není znám přesný mechanizmus, kterým buňka zvolí strategii pro reparaci DNA [24,25]. Jsou však známy faktory, které její výběr ovlivňují: záleží na stádiu buněčného cyklu, ve kterém se buňka nachází v době vzniku poškození DNA, dále na struktuře DNA konců vzniklých dvouvláknovým zlomem a v neposlední řadě je výběr určen i signálními drahami, jež se aktivují po poškození DNA [26].

Proteiny kódované geny *BRCA1* a *BRCA2* jsou důležité v procesech zajišťujících integritu genomu. Především hrají významnou roli v různých fázích opravy dvouvláknových zlomů DNA [27]. Bylo dokázáno, že ztráta funkce proteinů BRCA1/2 vede k reparaci DNA zatížené chybami, které mají za následek vznik genomové nestability, případnou ztrátu dalších TSG a vývoj tumoru [28].

1.4.1 Vysokopenetrantní a nízkopenetrantní geny spojené se vznikem karcinomu prsu a ovaria

Geny odpovědné za vznik karcinomu prsu a ovaria se dělí podle rizika spojeného se vznikem onemocnění na geny s vysokou, střední a nízkou penetrancí. Zatímco u nosičů patogenních mutací v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* je vysoká pravděpodobnost vzniku onemocnění (geny s vysokou penetrancí), u jiných genů je zvýšení rizika vzniku onemocnění oproti běžné populaci málo či středně zvýšené (geny se střední a nízkou penetrancí).

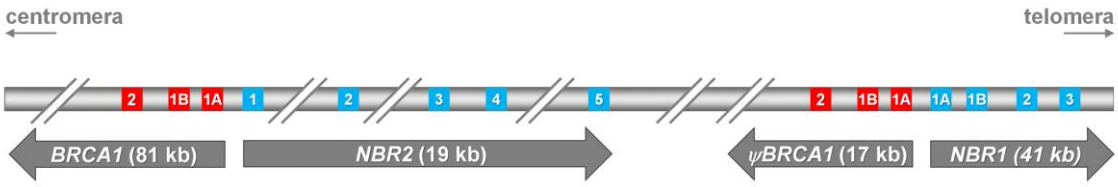
1.4.1.1 Geny s vysokou penetrancí

1.4.1.1.1 Gen a protein BRCA1

Oblast DNA zodpovědná za časný vývoj karcinomu prsu byla lokalizována na dlouhém raménku chromozómu 17 (17q21) v roce 1990 [29] a v roce 1994 byla identifikována sekvence odpovídající genu *BRCA1* (breast cancer gene 1) [30]. Gen *BRCA1* (OMIM 113705) zaujímá 81 kb genomové DNA (GenBank L78833) a má 24 exonů, z nichž 22 je kódujících [30,31]. Exony jsou číslovány 1-3 a 5-24, stejně tak i příslušné introny (GenBank U14680, L78833). Za exon 4 byla v původní práci Mikiho a spol. [30] považována vmezeřená *Alu* sekvence vedoucí ke vzniku předčasného stop kodónu. Čtecí rámec kóduje protein o 1863 aminokyselinách. Exon 11 je významně delší než ostatní a zaujímá více než 60% kódující sekvence genu. Ostatní exony jsou relativně malé. Celý region má neobvykle vysokou hustotu *Alu* repetitivní DNA (41,5%) [31].

Na obrázku 3 je schématicky znázorněn úsek vzniklý patrně duplikací DNA, ve kterém se nachází 5´ konec genu *BRCA1* [32]. Gen *BRCA1* leží "head-to-head" proti genu *NBR2* (Neighbor of *BRCA1* gene 2) a jejich transkripční startovací místa jsou vzdálena pouhých 218 bp [33]. Oba geny sdílejí obousměrný promotor [34], nicméně gen *NBR2* pravděpodobně nekóduje žádný protein. Ve vzdálenosti přibližně 30 kb směrem k teloméře se nachází stejně orientované geny *BRCA1* pseudogen (*ΨBRCA1*) a gen *NBR1*. Vysoká homologie byla nalezena mezi 5´ konci genů *BRCA1* a *ΨBRCA1* a mezi *NBR1* a *NBR2*. Gen *ΨBRCA1* je oproti genu *BRCA1* degenerovaný a je tvořen exony 1A, 1B a 2 a přilehlými introny. Gen *NBR1* má 20 kódujících exonů (3-22), které se přepisují do proteinu o délce 966 aminokyselin. Přesná funkce tohoto genu není známá. Rekombinace

mezi geny *BRCA1*/*ΨBRCA1* může vysvětlit řadu rozsáhlých delecí zasahujících lokus *BRCA1* [35,36].



Obrázek 3: Schématické znázornění duplikovaného regionu v oblasti chromozómu 17q21 (převzato z [32]). Homologní oblasti mezi *NBR1* a *NBR2* a mezi *ΨBRCA1* a *BRCA1* jsou znázorněna čtverci. Šipky představují směr transkripce jednotlivých genů. *NBR* – Neighbour of *BRCA1* gene.

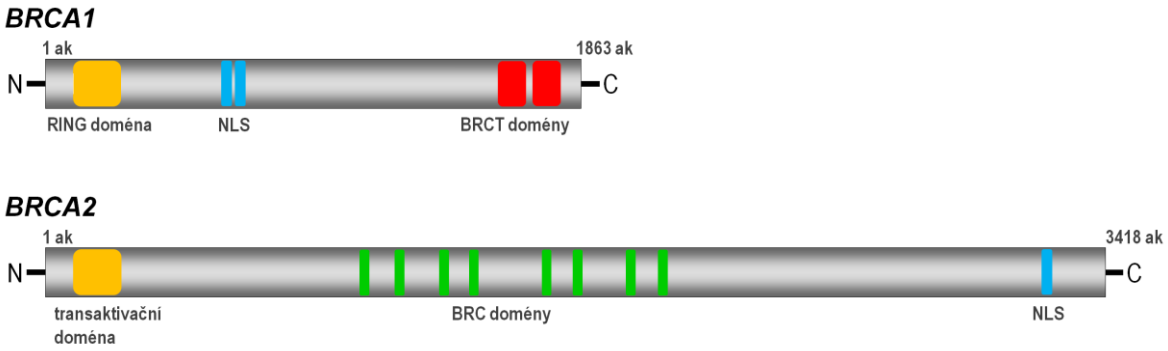
Protein BRCA1 je nukleární fosfoprotein tvořený 1863 aminokyselinami o molekulární hmotnosti 220 kDa. V proteinové struktuře byla popsána řada funkčních domén. Nejdéle známé a nejlépe probádané motivy jsou dvě konzervované interakční domény (obrázek 4). Na N-konci se nachází RING (really interesting new gene) doména (aminokyseliny 24 – 64) [30] a na C-konci jsou tandemově za sebou dvě BRCT (BRCA1 C- terminus) domény (BRCT-N: aminokyseliny 1653-1736 a BRCT-C: aminokyseliny 1760-1855) [37]. RING doména je vysoce konzervovaný proteinový motiv zinkového prstu (Cys_3-His-Cys_4 vázající kation Zn^{2+}), který se nachází v mnoha proteinech s E3 ubikvitin ligázovou aktivitou a podílí se na interakcích s řadou proteinů různých funkcí (např. regulátory buněčného cyklu, transkripční faktory) nebo interakcích proteinu s DNA. Protein BRCA1 je jako monomér nestabilní a prostřednictvím RING domény asociuje s RING doménou proteinu BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein 1). Vytvoří se tak stabilní heterodimer [38] se silnou E3 ubikvitin ligázovou aktivitou, která je podstatná pro proces reparace DNA [39,40].

C-koncový úsek genu obsahující BRCT domény se označuje také jako transaktivační doména. BRCT doména je motiv obsahující shluky hydrofobních aminokyselin, která váže fosforylované proteiny. BRCT domény mají i transkripčně aktivační funkci [41,42]. Díky specifické interakci protein-protein vznikají homomerní i heteromerní proteinové komplexy. BRCT domény se vyskytují v mnoha proteinech účastnících se oprav DNA a kontroly buněčného cyklu.

Na 5´ konci exonu 11 se nachází jaderný lokalizační signál NLS1 (Nuclear Localisation Signal), který je nezbytný pro translokaci nově nasyntetizovaného proteinu do

jádra buňky. Později byl v exonu 11 identifikovaný NLS2, jenž pro translokaci není tak významný [43,44]. Studie Hubera a spol. (2001) však poukazuje na fakt, že se do buněčného jádra translokuje i protein BRCA1 s deletovaným exonem 11, kde se oba nukleární lokalizační signály nacházejí [45]. Lze tedy předpokládat přítomnost alternativního jaderného signálu, který dosud nebyl identifikován (shrnuto v [46]).

Z přítomnosti řady funkčních domén vyplývá, že BRCA1 je multifunkční protein, který tvoří řadu proteinových komplexů s rozličným uplatněním při reparaci DNA a regulaci buněčného cyklu. Současné znalosti o účasti proteinu BRCA1 na zajišťování integrity genomu jsou shrnuty v nedávno publikovaném přehledu [47].



Obrázek 4: Schématické znázornění některých strukturních a funkčních domén proteinů BRCA1 a BRCA2.

1.4.1.1.2 Gen a protein BRCA2

V roce 1994 byl objeven gen *BRCA2* (breast cancer gene 2, OMIM 600185); klonován byl o rok později [48] a posléze lokalizován na dlouhé raménko chromozómu 13 (13q12-13) (GenBank NT_024524) [49]. Skládá se z 27 exonů, z nichž 25 nese kódující sekvenci o délce 10257 nukleotidů. Dva dlouhé exony 10 (c.1022-2137) a 11 (c.2138-7069) tvoří 59% celé kódující sekvence. Ostatní exony jsou relativně krátké.

BRCA2 je nukleární fosfoprotein tvořený 3418 aminokyselinami. Sekvence exonu 3 je podobná transaktivační doméně transkripčního faktoru c-Jun. Exon 11 obsahuje opakující se strukturní motiv, nazývaný BRC doména. Motiv se opakuje osmkrát v úseku aminokyselin 1002-2005 a je tvořen přibližně 70 aminokyselinami s korovou sekvencí obsahující 26 aminokyselinových zbytků. Šest BRC domén je vysoce konzervovaných a zprostředkovává interakci proteinu BRCA2 s RAD51 rekombinázou. Tato interakce má

zásadní význam pro pochopení úlohy proteinu BRCA2 v reparaci dvouřetězcových zlomů DNA. Na C-konci proteinu BRCA2 se nachází jaderný lokalizační signál. Schématické znázornění těchto domén je na obrázku 4. Funkci proteinu BRCA2 a jeho účast na kontrole integrity genomu shrnuje několik přehledů [50,51].

1.4.1.1.3 Gen *TP53* a protein p53

Gen *TP53* (OMIM 191170) patří mezi vysoce penetrantní geny. Lidská varianta genu byla klonována 1985 [52,53]. Nachází se na krátkém raménku chromozómu 17 (17p13.1) a má 11 exonů, z nichž 10 je kódujících. Produktem genu je jaderný tumor supresorový protein o 393 aminokyselinách s molekulovou hmotností 53 kDa. Obsahuje několik funkčních domén: například dvě transkripční aktivační domény (aminokyseliny 1-42 a 43-62), centrální doména vázající DNA (aminokyseliny 102-292), a tetramerizační doménu (aminokyseliny 323-356). Schématické znázornění domén je na obrázku 5. Protein p53 se váže na DNA ve formě tetraméru a je významným transkripčním faktorem zasahujícím do regulace buněčného cyklu a apoptózy [54]. Při poškození DNA dochází v buňce k akumulaci funkčních tetramerů p53, které indukují transkripci genu *p21*, inhibitoru komplexů cyklin/CDK. Tím je blokována fosforylace proteinu Rb, která je nezbytná pro vstup buňky do S fáze buněčného cyklu. Jestliže není oprava DNA možná, protein p53 aktivuje transkripci proapoptotického genu *Bax* a indukuje apoptózu [55].

Obrázek 5: Schématické znázornění některých strukturních a funkčních domén proteinu p53.

V nepoškozených buňkách je udržována nízká hladina proteinu p53. Hypoxie nebo poškození DNA vede k fosforylaci a acetylaci p53 a následně k vzestupu jeho hladiny [56]. Poškozením normální funkce p53 somatickou mutací se zvyšuje genomová nestabilita a počet mutací v dalších genech. Porušení funkce genu vede k závažnému fenotypovému projevu nádoru a nepříznivé prognóze onemocnění [57].

Somatické mutace genu *TP53* byly nalezeny v mnoha nádorech. *TP53* je nejčastěji mutovaným genem, jehož somatické alterace byly zachyceny ve více než 50% lidských nádorů. U karcinomu prsu jsou somatické mutace detekovány přibližně u 20% případů [58]. Většinou se jedná o missense mutace v oblasti kódující DNA vázající doménu, které vedou k akumulaci stabilního, avšak inaktivního proteinu v nádorových buňkách [59,60].

Zárodečné mutace genu *TP53* jsou většinou vázány na rodiny s Li-Fraumeniho syndromem (LFS; OMIM 151623). U heterozygotních nosičů mutace byl nalezen zvýšený výskyt různých nádorů, karcinomů prsu, nádorů mozku, sarkomů měkkých tkání, osteosarkomů, karcinomů nadledvin, leukémií a dalších malignit [61,62].

1.4.1.1.4 Geny se střední a nízkou penetrancí

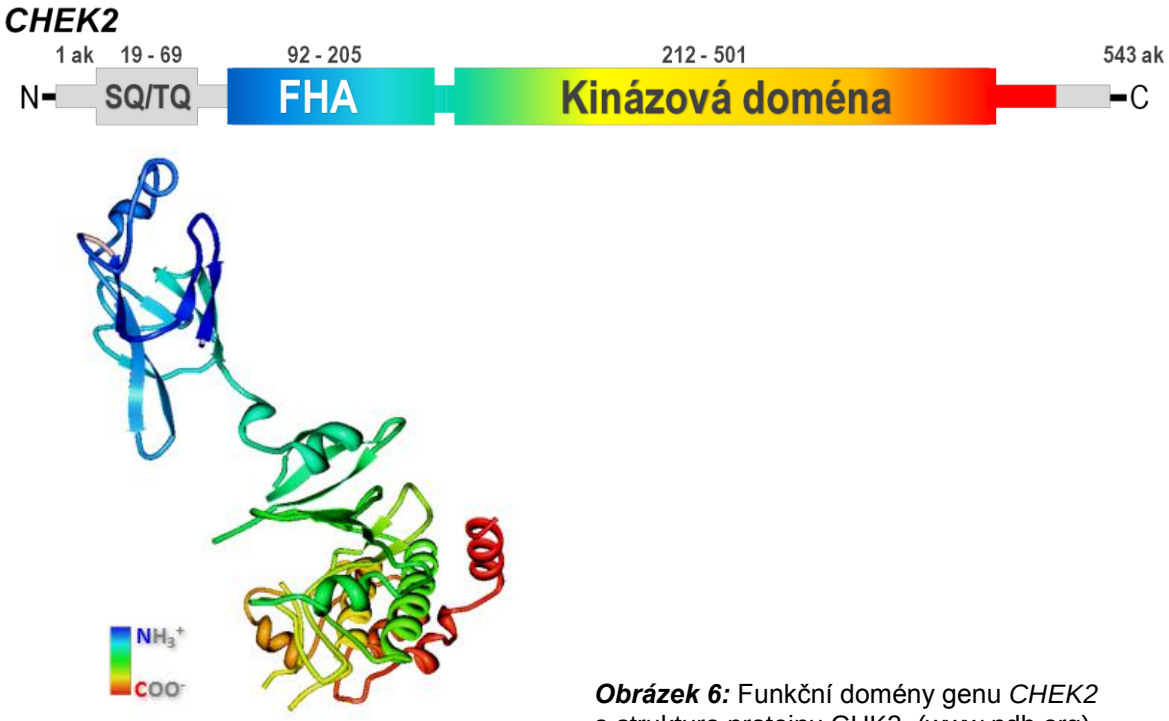
V současné době se mluví zejména o pěti významných středně a málo rizikových genech: *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1*, *PALB2* a *NBS1* [63]. V následujícím textu jsou stručně zmíněny pouze dva geny, jejichž mutační analýza se provádí v naší laboratoři.

1.4.1.1.5 Gen a protein CHEK2

Gen *CHEK2* (OMIM 604373) je lokalizovaný na dlouhém raménku chromozómu 22 (22q12.1) a kóduje jadernou proteinkinázu o 60 kDa. U tohoto genu jsou známy tři transkripční varianty kódující různé izoformy. Nejdelší lidská varianta genu kóduje proteinový řetězec tvořený sekvencí 543 aminokyselinových zbytků [64].

Aktivovaná checkpoint kináza 2 (CHEK2, alternativně CHK2) zabraňuje vstupu do mitózy inhibicí fosfatázy Cdc25C a je významným mediátorem signalizace spuštěné v důsledku poškození DNA. CHEK2 je aktivována fosforylací prostřednictvím fosforylované kinázy ATM a zprostředkovává transdukci signálu směrem k proteinovým komplexům účastnícím se reparace DNA a k regulátorům buněčného cyklu a apoptózy (p53, BRCA1, Cdc25A, Cdc25C) [65]. V polypeptidovém řetězci CHEK2 byly charakterizovány 3 funkční domény (shrnuto v [66], obrázek 6): doména bohatá na serin a threonin (SQ/TQ) na N-konci řetězce (aminokyseliny 20-75), FHA doména (fork head-associated domain) účastnící se vazby CHEK2 s dalšími fosforylovanými proteiny

(aminokyseliny 112-175) a serin/threonin kinázová doména (aminokyseliny 225-490). Doménou nezbytnou pro aktivaci proteinkinázy CHEK2 je FHA doména [67].



Obrázek 6: Funkční domény genu *CHEK2* a struktura proteinu CHK2. (www.pdb.org)

CHEK2 je tumor supresorový gen, jehož mutace predisponují heterozygotního nosiče k řadě rakovinných onemocnění [65,68,69], včetně karcinomu prsu [70]. Četnost zárodečných mutací v genu *CHEK2* byla odhadnuta v populaci amerických vysocerizikových pacientů s invazivním karcinomem prsu, z rodin s více než 4 případy karcinomu prsu nebo ovaria, na 4% [71]. V genu byly dosud popsány jak bodové mutace [68,72], tak rozsáhlá delece zasahující exony 8 a 9 [71]. V názvosloví této delece existují určité nesrovnalosti [73] způsobené tím, že do sekvence základní mRNA (sestřihová izoforma A) je přepsáno 14 kódujících exonů (gen *CHEK2* má 15 exonů, ale exon 2 je nekódující). Obvykle se nekódující exony nezapočítávají do popisu alterací, avšak v kitu pro MLPA analýzu (P045) a například i v publikaci Walshe a spol. [71] můžeme najít popis této mutace jako deleci exonů 9-10.

Analýza mikrosatelitových markerů odhalila u pacientů s delecí dlouhou 5395 bp stejný 650 kb haplotyp. Původ této founder mutace pravděpodobně může být v oblasti Česka či Slovenska [71]. Nejčastěji studovanou alterací je posunová mutace c.1100delC, která byla pozorována v různých populacích s různou frekvencí. V populacích severní

Evropy a Severní Ameriky byla označena za variantu odpovědnou za vznik karcinomu prsu. Studie zahrnující 718 *BRCA1/2* negativně testovaných západoevropských a severoamerických rodin vedla k odhadu, že tato varianta dvakrát zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu u žen [74]. Tento odhad byl potvrzen i dalšími studiemi [75].

1.4.1.1.6 Gen a protein ATM

Gen *ATM* (ataxia telangiectasia mutated, OMIM 607585) se nachází na chromozómu 11 v oblasti 11q22-23 [76]. Jedná se o rozsáhlý gen, který zaujímá v genomové DNA 150 kb, má 66 exonů a kódující sekvence obsahuje 9168 bp. Iniciační kodón leží ve čtvrtém exonu a translace končí terminačním kodónem v posledním exonu.

Protein ATM má 3056 aminokyselinových zbytků a jeho M_r dosahuje 350 kDa. Protein patří do enzymové rodiny fosfatidylinositol-3-ináz. Jedná se o serin/treonin-specifickou proteinkinázu, která rozpoznává dvouřetězcové zlomy DNA způsobené například působením ionizujícího záření, aktivuje se autofosforylací a následně prostřednictvím fosforylace mnoha substrátů aktivuje řadu signálních drah učastnících se zastavení buněčného cyklu a reparace DNA, případně aktivace apoptózy [77,78]. Mezi substráty ATM patří tumor supresory p53 a BRCA1, kinázy CHEK1 a CHEK2 (checkpoint kináza 1 a 2) zasahující do regulace buněčného cyklu a proteiny RPA (replication protein A), NBS1 (mutace u homozygotů jsou příčinou Nijmegen breakage syndrome) a FANCD2 (Fanconi anemia complementation group D2) odpovědné za zastavení buněčného cyklu v S fázi [77].

ATM patří ke klíčovým proteinům aktivovaným dvouřetězcovými zlomy DNA a odpovědným za zastavení buněčného cyklu. ATM se v menší míře nachází také v cytoplazmě, kde hraje pravděpodobně roli v buněčné odpovědi na oxidační stres [79].

Mutace v obou alelách genu *ATM* jsou příčinou autozomálně recesivního onemocnění ataxia telangiectasia. Jedná se o vzácné neurodegenerativní onemocnění s progradující mozečkovou ataxií, pro které jsou déle charakteristické okulokutánní telangiektazie, zhoršená imunita, zvýšená citlivost na ionizující záření a predispozice ke vzniku nádorů. Nejčastějšími malignitami jsou lymfomy a leukémie [80]. U heterozygotních nosiček mutace v genu *ATM* bylo zjištěno zvýšené riziko karcinomu

prsu [81,82,83]. Úlohu genu *ATM* při vzniku karcinomu prsu shrnula Prokopcová a spol. [65].

Více než 70% dosud popsaných mutací genu *ATM* vede k předčasné terminaci translace a vzniku zkráceného proteinu [84,85]. V české populaci tento typ mutace v *ATM* má u heterozygotních nosičů pravděpodobně význam při vzniku dědičného karcinomu prsu [86].

2. Úloha genů *BRCA1* a *BRCA2* u hereditárních nádorů

Rodinný výskyt karcinomu prsu je závažným rizikovým faktorem pro vznik onemocnění a u 5-8% karcinomů prsu se předpokládá přítomnost zárodečné mutace v jednom z hlavních predispozičních genů (geny *BRCA1/2)*. Zárodečné mutace v těchto genech jsou kromě časného nádoru prsu spojeny i se zvýšeným rizikem vývoje karcinomu ovaria, a proto se hereditární postižení označuje jako dědičný nádorový syndrom karcinomu prsu a ovaria [87]. Pro dědičné postižení genů *BRCA1/2* je charakteristický časný nástup onemocnění, vysoká incidence bilaterálního postižení a častý výskyt karcinomu ovaria. Rovněž je zvýšené riziko vzniku další řady onkologických onemocnění, jako je karcinom pankreatu, prostaty nebo tlustého střeva [88,89,90]. U většiny rodin (81%) s výskytem karcinomu prsu a ovaria je odpovědným genem *BRCA1*. Naopak většina rodin (76%), ve kterých onemocněli karcinomem prsu i muži, je spojená s mutací v genu *BRCA2* [87]. Riziko vzniku karcinomu ovaria je výrazně nižší u nosičů mutace genu *BRCA2* než u rodin s *BRCA1* mutací. Riziko vzniku karcinomu prsu u mužů je větší u nosičů mutace v genu *BRCA2* [88].

Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu je přibližně stejné u nosičů mutace genu *BRCA1* i *BRCA2* a může dosáhnout až 80%. Celoživotní riziko karcinomu ovaria pak bylo odhadnuto pro nosiče *BRCA1* mutace na 40 – 65% a pro nosiče alterace v genu *BRCA2* na 20% [87,91]. Analýza Kingové a spol. [91] odhalila u aškenázských Židů celoživotní riziko pro nosičky mutace v jednom z hlavních predispozičních genů na 82%. Riziko může být významně ovlivněno negenetickými faktory; například významně vyšší riziko do 50 let měli nosiči mutace narození po roce 1940 (67%) než nosiči narození před rokem 1940 (24%) [91].

Frekvence mutací genů *BRCA1/2* v běžné populaci je odhadována na 1:800 (0,125%) až 1:400 (0,25%); v populaci aškenázských Židů je výskyt přibližně 10x častější (1:40; 2,5%) [92]. Pomocí populačně genetických studií bylo možné odhadnout stáří některých mutací genu *BRCA1* až do období před začátkem n. l. [93]. De novo vzniklé mutace jsou vzácné.

Mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* zasahují celou kódující oblast genu. Většinu mutací tvoří nonsense mutace, krátké inserce a delece vedoucí k posunu čtecího rámce, předčasné terminaci translace a ke vzniku zkráceného proteinového produktu. K mutačnímu spektru přispívají rozsáhlé genové přestavby a dlouhé delece či duplikace. Rozsáhlé přestavby v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* jsou hlavním tématem předkládané práce a bude jim věnována zvláštní kapitola (kapitola 3, Str. 22).

Mutace v genu *BRCA1* jsou u většiny etnik častější než v genu *BRCA2*, avšak mutační spektrum se mezi populacemi liší. Přes velkou variabilitu v rozšíření jednotlivých mutací jsou některé mutace díky tzv. „founder“ efektu velice rozšířené v určitých definovaných geografických oblastech nebo u určitých etnik [94]. Founder mutace je taková mutace, která se objeví u jednoho či více jedinců, kteří se stanou zakladateli určité populace a šíří tak mutaci do dalších generací. Příkladem může být mutace c.187_188delAG genu *BRCA1*, která se vyskytuje přibližně v 1% mezi Židy [95]. Dále *BRCA1* mutace c.5385dupC, která je nejběžnější mutací v Rusku a ve východní a střední Evropě a pravděpodobný původ má v oblasti Pobaltí [94]. V holandské populaci byla popsána řada founder mutací a na některých byla demonstrována specifická geografická distribuce [96]. Pomocí metod umožňujících analýzu rozsáhlých delecí bylo zjištěno, že dvě z nalezených delecí genu *BRCA1* tvoří nejvýznamnější podíl founder mutací v holandské populaci [97].

Dědičné mutace genu *BRCA2* jsou v populaci poměrně vzácné (okolo 1:1000 jedinců) a pouze u Islanďanů jsou mutace v tomto genu častější než v *BRCA1*. Navíc se zde vyskytuje převážně jedna varianta c.999-1003del5 genu *BRCA2* odpovědná za téměř všechny dědičné případy s karcinomem prsu a/nebo ovaria a vyskytuje se u 0,6% islandské populace [98]. Tato mutace je ukázkovým případem founder mutace izolované populace. Díky founder efektu je více rozšířená i *BRCA2* mutace c.6174delT, která se vyskytuje u 1,5% Židů a vysvětluje 3,7% případů s invazivním karcinomem prsu [91,99].

Přibližně u 30% vysoce rizikových rodin nebyla nalezena mutace ani v jednom z hlavních predispozičních genů, což svědčí pro existenci dalších odpovědných genů [87].

2.1. Spektrum mutací v České republice u rizikových pacientů s karcinomem prsu nebo ovaria

V obou hlavních predispozičních genech, *BRCA1* a *BRCA2*, bylo dosud v rizikových rodinách zachyceno více než 1000 různých patogenních mutací, které jsou společně s dalšími popsanými sekvenčními variantami shromážděny v databázi Breast Cancer Information Core (BIC) (http://research.nhgri.nih.gov/bic/). V České republice, podobně jako v dalších populacích, patří mezi nejčastější patogenní alterace krátké inserce a delece a nonsense mutace vedoucí k předčasnému ukončení translace a vzniku zkráceného proteinu. Ve skupině 735 vysoce rizikových pacientů s karcinomem prsu nebo ovaria byly mutace genu *BRCA1* zachyceny u 132 jedinců včetně šestnácti s detekovanou rozsáhlou genovou přestavbou (17,9%, Tab. 2) a mutace genu *BRCA2* u 38 jedinců (5,2%, Tab. 3) [100].

Spektrum mutací, které jsou rozptýlené v celé kódující genové oblasti, je poměrně široké; u genu *BRCA2* bylo zachyceno minimum opakujících se alterací (Tab. 3).

V české populaci je u genu *BRCA1* výskyt opakujících se mutací poměrně vysoký. U pacientů z pražského regionu a okolí, byly 4 nejčastěji se opakující mutace genu *BRCA1* (c.300T>G, c.1806C>T, c.3819_3823del5 a c.5385dupC) detekovány u přibližně 68,2% (90/132) nosičů mutace tohoto genu (Tab. 2). Na Moravě zahrnovalo pět founder mutací, 3 v genu *BRCA1* (c.300T>G, c.3819_3823del5 a c.5385dupC) a 2 v genu *BRCA2* (c.7913_7917del5; c.8537_8538del2) přibližně 52% (153/294) nalezených genových alterací [101]. Mutace genu *BRCA1* jsou v moravské populaci přibližně dvakrát častější než mutace genu *BRCA2* [101], naproti tomu v Čechách tvoří mutace genu *BRCA1* více než 77,6% (132/170) všech patogenních mutací (Tab. 2 a 3) [101,102].

Frekvenci výskytu dědičných mutací genů *BRCA1/2* u pacientů s karcinomem prsu lze odhadnout na základě výsledků mutační analýzy u neselektovaného souboru pacientů s tímto nádorovým onemocněním. V České republice byla četnost výskytu mutací genů *BRCA1/2* u karcinomu prsu odhadnuta na 2,8% [103].

Rozsáhlé delece a přestavby zasahující lokusy *BRCA1/2* nebyly v české populaci dlouho známy. Prvními pozitivními výsledky byly jejich průkazy v České republice a na Moravě v oblasti genu *BRCA1* [104,105].

Tabulka 2: Spektrum bodových mutací a krátkých delecí a inzercí genu *BRCA1* detekovaných u českých pacientů [100].

Exon / intron	Mutace dle cDNA	Předpokládaný efekt mutace	Počet rodin
2	c.187_188delAG	p.Glu23ValfsX17	**2**
5	c.300T>G	p.Cys61Gly	**11**
11	c.1135delA	p.Lys339ArgfsX2	**1**
11	c.1246delA	p.Asn376IlefsX18	**2**
11	c.1323delG	p.Glu402SerfsX8	**1**
11	c.1806C>T	p.Gln563X	**11**
11	**c.1866A>T**	**p.Lys583X**	**1**
11	c.2382G>T	p.Glu755X	**2**
11	c.2530_2531delAG	p.Gln804LeufsX5	**4**
11	**c.3345delA**	**p.Arg1076GlufsX5**	**1**
11	c.3358T>A	p.Leu1080X	**1**
11	c.3450C>T	p.Gln1111X	**1**
11	c.3819_3823del5	p.Val1234GlnfsX8	**9**
11	c.3875_3878del4	p.Ser1253ArgfsX10	**3**
11	c.4184_4187del4	p.Asn1355LysfsX10	**1**
12	c.4284_4285delAG	p.Ser1389X	**2**
13	**c.4333delT**	**p.Ile1405LysfsX10**	**1**
i-18	**c.5271+1G>A**	**p.Trp1718SerfsX2**	**1**
20	c.5370C>T	p.Arg1751X	**1**
20	c.5385dupC	p.Gln1756ProfsX74	**59**
24	**c.5673delA**	**p.Thr1852ProfsX3**	**1**

Nomenklatura mutací: +1 odpovídá A z ATG iniciačního kodónu translace v referenční sekvenci GenBank U14680.
Nové mutace jsou označeny červeně; i - intron.

Tabulka 3: Spektrum bodových mutací a krátkých delecí a inzercí genu mutací genu *BRCA2* detekovaných u českých pacientů [100].

Exon / intron	Mutace dle cDNA	Předpokládaný efekt mutace	Počet rodin
2	c.231G>A	pMet1Ile	1
i-5	c.703+1G>T	p.Val159GlyfsX10	1
9	c.999_1003del5	p.Asn257LysfsX17	1
10	c.1524_1525delGA	p.Asn433ThrfsX18	1
10	c.1642C>T	p.Gln472X	2
10	c.2001_2004del4	p.Ile591MetfsX22	1
11	c.2745C>A	p.Tyr839X	1
11	c.3036_3039del4	p.Ala938GlnfsX22	1
11	3304A>T	p.Lys1026X	1
11	c.3423_3426del4	p.Thr1067LeufsX10	1
11	c.3827_3828delGT	p.Cys1200X	1
11	c.4075_4076delGT	p.Val1283LysfsX2	2
11	**c.4167delC**	**p.Tyr1313X**	**1**
11	c.4206_4209dup4	p.Ala1327CysfsX4	1
11	c.4512dupT	p.Gln1429SerfsX9	1
11	c.5466dupT	p.Asn1747X	1
11	c.5873C>A	p.Ser1882X	2
11	c.5910C>G	p.Tyr1894X	3
11	c.5950_5951delCT	p.Leu1908ArgfsX2	2
11	c. 5991dupT	p.Ala1922CysfsX2	2
11	c. 6174delT	p.Ser1982fsX21	2
11	c.6672dupT	p.Ile2149TyrfsX	1
11	c.6677_6678delAA	pLys2150SerfsX25	1
11	c.6982dupT	p.Ser2252PhefsX9	1
14	**c.7379_7380delAA**	**p.Gln2384ArgfsX7**	**1**
15	c.7823_7824insTT	p.Pro2532fsX20	1
17	c.8141_8145del5	p.Phe2638X	1
18	**c.8270_8271delCA**	**p.Thr2681CysfsX11**	**1**
20	c.8763_8766del4	p.Arg2845fsX17	1
25	c.9631delC	p.Leu3135PhefsX28	1

Nomenklatura mutací: +1 odpovídá A z ATG iniciačního kodónu translace v referenční sekvenci GenBank U43746. Nové mutace jsou označeny červeně; i - intron.

Dalšími často vyšetřovanými geny u pacientů s rodinným výskytem karcinomu prsu nebo ovaria jsou geny *CHEK2*, *TP53* a *ATM*. Walsh a spol. odhadli, že mutace v genech *CHEK2* a *TP53* se vyskytují přibližně u 5% vysoce rizikových amerických rodin se čtyřmi a více případy karcinomu prsu nebo ovaria [71].

V České republice byly ve vysoce rizikových rodinách s výskytem karcinomu prsu a ovaria tyto geny rovněž studovány a jejich mutace byly rovněž výrazně méně časté než mutace hlavních predispozičních genů. Mutace genu *ATM* byly prokázány u 4 pacientů (0,7%; 4/566) (Tab. 4) [86]. Mutační analýza genů *CHEK2* a *TP53* jsou předmětem předkládané práce.

Tabulka 4: Spektrum mutací genu *ATM* detekovaných u českých pacientů [100].

Exon / intron	Mutace dle cDNA	Předpokládaný efekt mutace	Počet rodin
i-36	c.5177+1G>A	p.Glu1669Val fs11X	**1**
42	c.5932C>T	p.Glu1978X	**1**
i-43	c.6096-9del5	p.Arg2052Arg fs15X	**2**

Nomenklatura mutací: +1 odpovídá A z ATG iniciačního kodónu translace v referenční sekvenci GenBank U33841.

Úloha genů *TP53* a *BRCA1/2* v tumorogenezi je výrazně odlišná u hereditárních a sporadicky se vyskytujících případů karcinomu prsu. Zatímco hereditární mutace genu *TP53* jsou velmi vzácné [106], ve sporadických nádorech byly somatické mutace tohoto genu zachyceny u 12,7% (9/71) případů (nepublikovaná data). Naproti tomu, dědičné mutace genů *BRCA1/2* byly zachyceny u 23% pacientů (170/740), zatímco somatické mutace byly prokázány jen u genu *BRCA1* u dvou ze 40 analyzovaných pacientů se sporadickým karcinomem prsu (5%) [5].

3. Rozsáhlé genomové přestavby

Za rozsáhle genomové přestavby se považují delece či duplikace (případně triplikace či multiplikace) dlouhých oblastí genomové DNA, které mohou zasahovat jeden nebo několik exonů, ale i celou kódující sekvenci studovaného genu. V některých případech se může jednat také o komplexní přestavby zahrnující deleci a současnou inzerci v místě zlomu.

3.1 Rozsáhlé přestavby v genu *BRCA1* a *BRCA2*

Jelikož rozsáhlé genomové přestavby nejsou v řadě případů zachyceny při analýzách založených na PCR amplifikaci cílové oblasti DNA, byla první přestavba v genu *BRCA1* popsána až tři roky po jeho identifikaci. Jednalo se o deleci zasahující exon 17 a byla nalezena v Americké rodině [107]. V posledních deseti letech byla mnoha skupinami detekována a charakterizována řada přestaveb a jejich spektrum se stále rozšiřuje. Obzvláště výrazné zvýšení výskytu přestaveb lze pozorovat v posledních 4 letech [108], což je pravděpodobně důsledek rozšířeného používání metody MLPA (viz. kapitola 3.2.1, str. 25) k detekci deletovaných či duplikovaných úseků.

Zastoupení rozsáhlých přestaveb v genech *BRCA1/2* se liší. Častěji je tento typ alterace detekován v genu *BRCA1* [108,109], což se připisuje vyššímu zastoupení *Alu* sekvencí v lokusu *BRCA1* (42%) než je tomu u *BRCA2* (20%) [31,110]. *Alu* repetice mohou být podkladem pro nerovnoměrnou homologní rekombinaci, která může vést ke vzniku dlouhých delecí [111]. Homologní rekombinace se typicky vyskytuje v genu *BRCA1*, zatímco pro gen *BRCA2* je obvyklejší rekombinace v nehomologních sekvencích [108].

V lokusu *BRCA1* jsou rozsáhlé přestavby poměrně častými alteracemi a většina z nich je jedinečná (53/81) [108]. U řady populací představují 8-10% detekovaných genových mutací [109,112,113,114,115,116] a v některých případech může být jejich podíl, díky founder efektu, i vyšší. Například, dvě holandské founder mutace, delece exonu 13 a delece exonu 22, představovaly 36% (12/33) mutací genu *BRCA1* detekovaných ve 170 rodinách s výskytem karcinomu prsu [97] a jejich podíl byl vysoký i v pozdější rozšířené studii zahrnující 805 pacientů, kdy tyto dvě delece tvořily 23% (28/121) *BRCA1* mutací [117]. Další rozšířenou founder mutací je duplikace exonu 13, která byla poprvé popsána u jedné portugalské a třech amerických rodin [118], ale je častá i v Austrálii a dalších evropských i amerických oblastech [119]. Původ má tato alterace pravděpodobně v severní Anglii [119]. Vysoké zastoupení rozsáhlých přestaveb genu *BRCA1* bylo prokázáno také v Itálii, kde představovaly 19% všech detekovaných *BRCA1* mutací [120]. Rozsáhlé přestavby genu *BRCA1* naopak hrají malou roli u pacientek v Jižní Africe [108] a u Židů také dosud nebyly detekovány žádné přestavby ani v jednom z genů *BRCA1/2* [121]. Přestavby genu *BRCA2* nebyly dosud detekovány v řadě populací [108,122,123,124] a v některých geografických lokalitách se vyskytují pouze zřídka [113,115,125,126].

V nedávném přehledu jsou shrnuty údaje o 81 různých, dosud popsaných, přestavbách v genu *BRCA1* a 17 v genu *BRCA2* [108]. Většinu rozsáhlých přestaveb genu *BRCA1* představují delece; méně se vyskytují duplikace a komplexní přestavby zahrnující jak deleci tak inzerci; inzerce, podobně jako triplikace, byla popsána jediná. Alterace postihovaly všechny exony genu *BRCA1*, zatímco žádné přestavby nezasahovaly poslední exony genu *BRCA2*. Genomové přestavby zasahovaly oblasti o velikosti stovek bází až po desítky kilobazí. Nadpoloviční většina alterací v genu *BRCA1* (56%) i *BRCA2* (71%) byla spojena s posunem čtecího rámce a vedla k předčasnému ukončení translace a zkrácení proteinového produktu [108].

3.2 Metody detekce rozsáhlých přestaveb

Pro detekci delecí či duplikací oblastí zahrnujících stovky až desítky tisíc bází nebo celé geny byla vyvinuta řada metod.

První přestavby v genu *BRCA1* byly detekovány v roce 1997 [97,107,127] pomocí metod z konce minulého století. Southernův blotting se často kombinoval s technikami založenými na analýze RNA (respektive cDNA) a PTT (protein-truncation test) [97,107,116,127,128,129,130,131,132]. Gad a spol. detekoval rozsáhlé přestavby pomocí metody barvení oblastí *BRCA1* a sledování barevného kódu [114]. Nevýhodou Southernova blottingu byla časová náročnost a pracnost analýzy vyžadující velké množství kvalitního genetického materiálu. Analýzy prováděné na úrovni cDNA jsou spolehlivé, avšak získání kvalitní RNA může být někdy obtížné. Výsledek analýzy cDNA může být navíc ovlivněn degradací aberantní mRNA - tzv. nonsense mediated decay [133]. Přesto byly analýzami cDNA odhaleny některé rozáhlé genomové přestavby [71,105]. Alternativou zmíněných technik pro rutinní použití měla být metoda umožňující určit počet kopií genových úseků, založená na kvantitativní PCR v reálném čase (real-time PCR-based gene dosage assay), která se však neprosadila [134].

Později nastoupily vysoce kapacitní metody založené na detekci počtu kopií sledovaných oblastí ve vzorku genomové DNA. V březnu roku 2002 byla detekce přestaveb v genu *BRCA1* prováděna pomocí multiplexní PCR krátkých fluorescenčně značených fragmentů pokrývající příslušnou oblast [135], avšak záhy byla nizozemskou skupinou navržena pro detekci genomových delecí a duplikací metoda MLPA (Multiplex

Ligation-dependent Probe Amplification; viz. kapitola 3.2.1, str. 25) [136]. Metoda byla použita i pro detekci a charakterizaci přestaveb v genu *BRCA1* [117]. Ve stejné době bylo v práci Frolova a spol. [137] poprvé popsáno úspěšné využití DNA čipu pro detekci velkých přestaveb u ovariálních karcinomů. Tento čip obsahoval 30 různých spotů představujících jednotlivé amplifikované exonové oblasti genu *BRCA1* o velikosti 210-560 nukleotidů (pro nejdelší exon 11 bylo nasyntetizováno 9 specifických úseků), ke kterým hybridizovaly testovaná a kontrolní DNA odlišně fluorescenčně značené. Z poměrů intenzit fluorescence lze odhadnout ztrátu nebo zisk počtu kopií jednotlivých detekovaných oblastí. Další modifikace této metody vedla k navržení oligonukleotidové aCGH (oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization), tedy komparativní genomové hybridizace, při které jsou testovaná a kontrolní DNA hybridizovány k oligonukleotidovým sondám umístěným na sklíčku [138]. Alternativním přístupem pro přesnější ohraničení rozsáhlé alterace je použití mikročipové SNP (Single nucleotide polymorphisms) analýzy [139].

Další hybridizační metodou vhodnou pro studium genomových delecí, amplifikací či přesunů je FISH (Fluorescent in situ Hybridization) v různých modifikacích, jejíž nevýhoda však tkví v časové náročnosti analýzy a v nízkém rozlišení. Touto metodou není možné detekovat alterace zahrnující desítky či stovky bází [140,141].

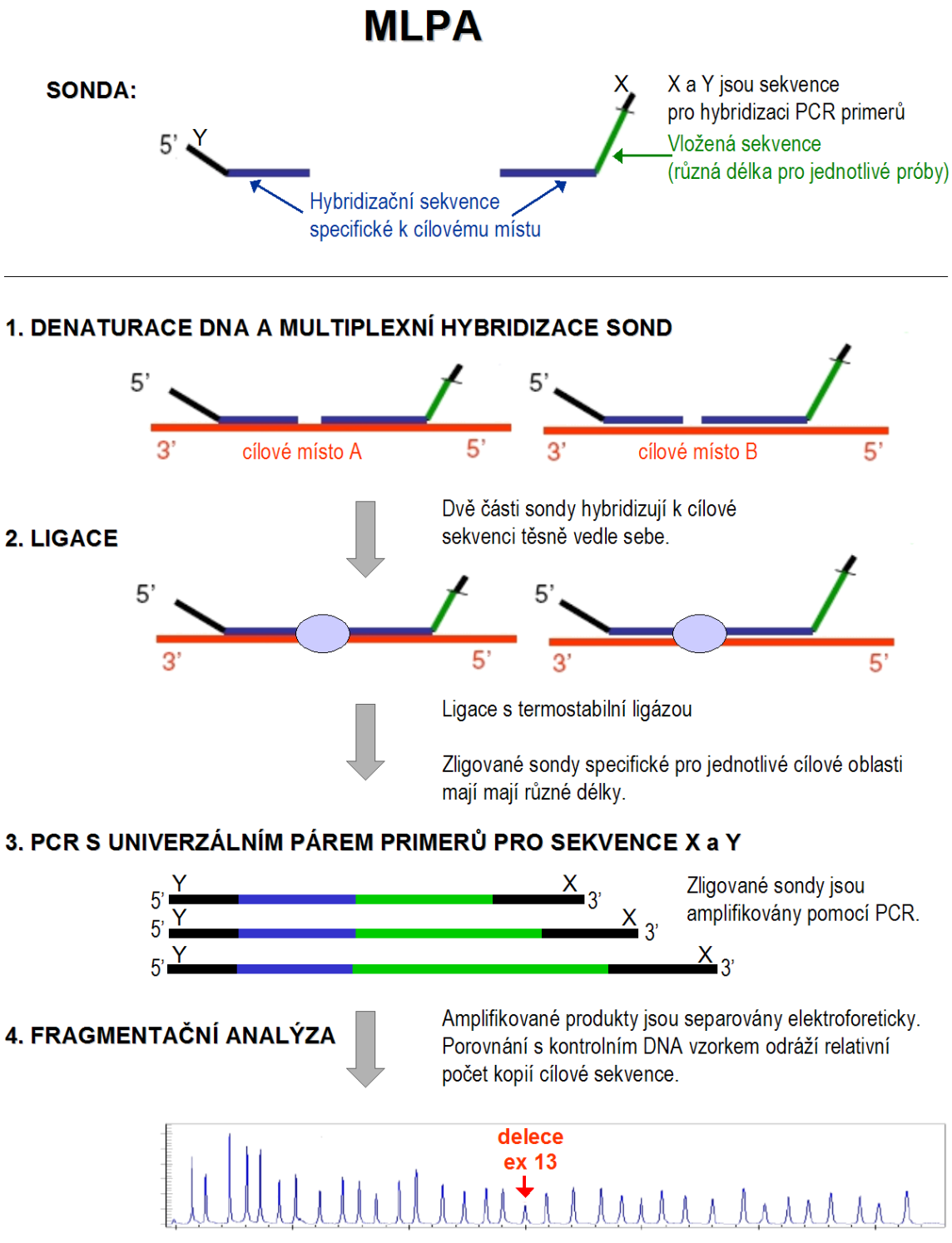
Jednoznačně nejvyužívanější metodou pro screening rozsáhlých genových delecí a duplikací je MLPA analýza, jejíž použití se dostalo i do diagnostické praxe.

3.2.1 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

MLPA analýza (www.mrc-holland.com) je relativně nová technicky nenáročná metoda, která našla svoje uplatnění v klinické diagnostice. Je založena na relativní kvantifikaci počtu kopií amplifikovaných fragmentů, které odpovídají jednotlivým exonům. Proto se MLPA využívá především k průkazu delecí či duplikací části nebo celého testovaného genu. Tyto rozsáhlé delece či duplikace jsou těžko detekovatelné standardně používanými PCR metodami, protože deletovaná či duplikovaná oblast může přesahovat priméry ohraničený amplifikovaný fragment a dojde pak k namnožení pouze normální alely. V jedné reakční směsi je možné sledovat aberace až u 50 testovaných úseků.

Metoda (Obr. 7) je založena na hybridizaci sond k cílovým sekvencím, kterými jsou často exony analyzovaného genu. Ke každé cílové sekvenci hybridizují dvě bezprostředně sousedící sondy, jejichž následná ligace je podmínkou pro amplifikaci. Amplifikace ligovaných sond (nikoli cílové sekvence) probíhá po jejich denaturaci. Pro amplifikaci je zapotřebí, oproti klasické multiplexní PCR, jeden pár primérů, protože konce sond obsahují univerzální sekvence pro nasedání primérů. Na jedné sondě je prodlužovací sekvence, která zajistí různě dlouhé PCR produkty cílových sekvencí. Každá zligovaná sonda má jedinečnou délku a PCR produkty (od 130 do 480 nukleotidů) mohou být rozděleny kapilární elektroforézou. Porovnáním elektroforeogramů, respektive změřením plochy nebo výšky jednotlivých vrcholů a výpočtu relativního množství každé sondy (odpovídajících stejné cílové sekvenci ve vzorcích) mohou být odhaleny cílové sekvence s odlišným počtem kopií v genomové DNA. Z laboratorního vybavení je nutný pouze termocyklér s vyhřívaným víkem a genetický analyzátor pro provedení fragmentační analýzy. Další nespornou výhodou MLPA analýzy je minimální množství analyzované DNA (20 ng).

Nicméně MLPA analýza nepodává informaci o lokalizaci bodů zlomu, a proto se začaly využívat oligonukleotidové mikročipy pro komparativní genomovou hybridizaci (aCGH; str. 28), které s vysokým rozlišením přesněji určí hranice deletovaných či duplikovaných oblastí. Výhodou MLPA je však nízká cena; metoda rovněž umožnila rychlou molekulární analýzu v predisponovaných rodinách.



Obrázek 7: Princip MLPA analýzy. (Převzato z [136])

3.2.2 Oligonukleotidová aCGH (Oligonucleotide array-based Comparative Genomic Hybridization)

Oligonukleotidová array komparativní genomová hybridizace je robustní, relativně nová metoda, která umožňuje sledovat změny počtu kopií jednotlivých oblastí testované DNA na základě srovnání s kontrolním vzorkem DNA. Metoda je založena na hybridizaci mezi oligonukleotidovými sondami nasyntetizovanými na sklíčku (mikročipu) a ekvimolární směsí různě fluorescenčně značené kontrolní a testované genomové DNA. Oligonukleotidové próby lze *in silico* navrhnout a validovat pro jakoukoli studovanou oblast genomu. Přípravě mikročipů s oligonukleotidovými sondami, které by byly vhodné pro hybridizaci s celou genomovou DNA se poprvé zabýval Barett a spol. [142]. Výsledky jeho práce vedly k vytvoření oligonukleotidových čipů, na kterých bylo možné detekovat amplifikace a delece genomových oblastí menších než 100 kb. Kromě vysokého rozlišení je další výhodou malé množství DNA (~1μg) potřebné pro hybridizaci.

V současné době jsou oligonukleotidové čipy komerčně dostupné od několika firem, (např. Nimblegen a Agilent Technologies). Jsou k dispozici oligonukleotidové mikročipy pro různá specifická využití. Pro vyšetření genomové DNA jsou nabízeny čipy specifické pro jeden chromozóm nebo pro více testovaných lokusů z různých chromozómů dle potřeb zákazníka, nebo čipy celogenomové. Rozlišovací schopnosti genomové array CGH závisí na hustotě oligonukleotidových sond. Při vysoké hustotě sond byla místa zlomu při deleci či duplikaci DNA určena s přesností na desítky nukleotidů. Pro úspěšné pokrytí celého genomu může být dnes na jedno sklíčko natečkováno přes dva 2 milióny oligonukleotidových sond.

Dánská skupina zabývající se detekcí přestaveb v genech *BRCA1* a *BRCA2* prezentovala využití tzv. zoom-in aCGH, kde DNA čip obsahoval oligonukleotidové sondy mapující více genů najednou [126].

Technologie oligonukleotidové array CGH představuje díky možnosti rozsáhlého skreeningu genomových změn a plné automatizace jeden z nejlepších nástrojů genetického studia na úrovni DNA.

4. Určení pravděpodobnosti nosičství mutace v genech *BRCA1/2*

Byla vyvinuta řada počítačových programů, které jsou zaměřeny na určení rizika vzniku karcinomu prsu; jiné hodnotí pravděpodobnost nosičství mutace v hlavních predispozičních genech. Odhad rizika umožňuje rozhodnout, zda se má pacient podrobit genotypizaci či nikoli; v klinické praxi pak slouží pro individuální rozhodnutí o preventivní péči (četnost mamografických vyšetření, chemoprevence nebo preventivní chirurgický zákrok).

Pro indikaci genetického vyšetření je významný statistický model využívající algoritmus pro odhad pravděpodobnosti, se kterou daný jedinec nese zárodečnou mutaci v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*. V zahraničí je často užívaný model BRCAPRO (http://astor.som.jhmi.edu/BayesMendel/brcapro.html) vyvinutý v 90. letech v USA. Výpočet pravděpodobnosti je založen na kombinovaném posouzení rodinné zátěže (případy karcinomu prsu, včetně karcinomu prsu u muže a ovaria v rodině) a individuálních anamnestických dat (věk při stanovení diagnózy, přítomnost synchronního či metachronního bilaterálního karcinomu prsu, přítomnost nádorové duplicity).

Pro výpočet pravděpodobnosti nosičství mutace v genech *BRCA1/2* byla vyvinuta řada dalších programů V rozsáhlé americké studii porovnávající sedm nejčastěji používaných modelů byl upřednostněn Mendelovský model BRCAPRO, jehož výsledky se ve vysokém procentu shodovaly s výsledky genetického testování [143]. Nedávné studie však ukázaly, že dochází k mírnému podhodnocení pravděpodobnosti nosičství, které se neobjevilo při hodnocení pravděpodobnosti klinickým genetikem podle rodinné historie [144].

PRACOVNÍ HYPOTÉZA A CÍLE STUDIE

Studium odpovědných genů u hereditárního karcinomu prsu bylo na ÚBEO zahájeno v roce 1998. Podařilo se charakterizovat spektrum mutací hlavních predispozičních genů *BRCA1/*2 a vysvětlit jejich podíl na vývoji karcinomu prsu v naší populaci. Byly určeny populačně specifické mutace těchto genů a optimalizována mutační analýza. Kauzální mutaci genů *BRCA1/2* se však nepodařilo detekovat u vysokého procenta rizikových rodin.

Rozsáhlé delece a přestavby genu *BRCA1* u pacientek z vysoce rizikových rodin byly v České republice poprvé popsány v roce 2007 [104]. Rovněž studie naší laboratoře, vycházející z analýzy RNA (resp. cDNA), naznačila v pilotní studii význam těchto alterací u dědičného karcinomu prsu [105]. Gen *ATM* pak byl dalším odpovědným genem, jehož analýza byla prováděna u rizikových pacientů a jehož význam v tumorogenezi byl studován [86].

Cílem studie byla analýza rozsáhlých genomových přestaveb zasahujících lokusy *BRCA1/2* u rizikových pacientek s karcinomem prsu a ovaria převážně z pražského regionu. MLPA se jevila jako vhodná technika umožňující retrospektivně analyzovat více než 580 pacientek negativně testovaných na přítomnost krátkých mutací genů *BRCA1/2*. Záměrem studie bylo mutace charakterizovat, určit místa zlomů, eventuálně definovat složitější přestavby a určit v poměrně velké skupině pacientek frekvenci jejich výskytu a rozšíření jednotlivých genových alterací. Konečným cílem pak bylo definovat kritéria pro testování rozsáhlých přestaveb genů *BRCA1/2* v naší populaci.

Ve skupině testovaných pacientek byla dále věnována pozornost analýze genů *TP53* a *CHEK2*, které rovněž patří k důležitým kandidátním genům u hereditárního karcinomu prsu. U genu *TP53*, kde bylo popsáno několik tisíc patogenních mutací, bylo cílem analyzovat celou kódující genovou oblast. Naopak u genu *CHEK2* jsme se zaměřili na detekci dvou nejčastějších alterací (c.1100delC a rozsáhlou deleci zasahující exony 8-9).

MATERIÁL A METODY

1. Pacienti

Výběr pacientů pro genetické testování byl učiněn na Ústavu biologie a lékařské genetiky, na Onkologické klinice a na Gynekologicko-porodnické klinice, 1. lékařské fakulty, Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze v letech 2002-2009. Kritéria pro testování genů *BRCA1/2* sledovala směrnice schválené Českou onkologickou společností a Společností lékařské genetiky a publikováné v roce 2003 s aktualizací v roce 2009 [145,146]. Všichni pacienti byli české národnosti a jejich převážná část pocházela z Prahy a okolí. Skupina 740 pacientů byla nejdříve vyšetřena na přítomnost bodových mutací a krátkých delecí či inzercí genů *BRCA1/2*, jak bylo popsáno [102], a pacienti s negativním nálezem v kódující genové oblasti (586 pacientů) byli dále testováni na přítomnost rozsáhlých delecí a přestaveb zasahujících tyto geny a pozornost se rovněž zaměřila na analýzu dalších predispozičních genů (*TP53* a *CHEK2*). Skupina 586 negativně testovaných osob zahrnovala 276 pacientů z vysoce rizikových rodin (jsou zde označovány jako případy familiární/hereditární) a 310 pacientů vybraných bez ohledu na nepřítomnost hlášeného nádorového onemocnění v rodině (jsou označovány jako případy nefamiliární/sporadické). První skupina splňovala u příbuzných prvního a druhého stupně následující kritéria: (1) dva případy (včetně probanda) buď s karcinomem prsu diagnostikovaným do 50 let a/nebo s karcinomem ovaria diagnostikovaným v jakémkoliv věku, (2) alespoň tři případy (včetně probanda) s karcinomem prsu a/nebo ovaria (bilaterální karcinom je brán jako dva nádory) v jakémkoliv věku. Celkem ve 186 rodinách se vyskytl pouze karcinom prsu (HBC families – rodiny s hereditárním syndromem karcinomu prsu), v 80 rodinách byl zaznamenán výskyt jak karcinomu prsu, tak karcinomu ovaria (HBOC families – rodiny s hereditárním syndromem karcinomu prsu a ovaria) a v 10 rodinách pak byly zachyceny pouze případy karcinomu ovaria (HOC families – rodiny s hereditárním syndromem karcinomu ovaria). Druhá skupina zahrnovala pacientky s karcinomem prsu do 35 let (147 případů) nebo s karcinomem ovaria do 40 let (69 případů), pacientky s bilaterálním karcinomem prsu (první diagnóza do 50 let; 29 případů), pacientky s primárním karcinom prsu a ovaria (19 případů) nebo s medulárním či atypickým medulárním karcinomem prsu (20 případů) a případy karcinomu prsu u muže (17 případů). Dále byly do souboru zahrnuty případy s tzv. receptorovou triple negativitou (negativitou receptorů ER, PR a HER2/neu – 9 případů).

Od všech testovaných osob byl získán písemný informovaný souhlas s genetickým vyšetřením, který byl schválen Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice.

2. Izolace genetického materiálu

Od každého pacienta bylo odebráno cca 10 ml periferní krve do zkumavek s EDTA pro izolaci genetického materiálu.

2.1 Izolace DNA z periferní krve

DNA byla izolována pomocí Wizard Genomic DNA Purification System (Promega, USA) podle instrukcí výrobce.

2.2 Izolace RNA z periferní krve

Vzorky čerstvé nesrážlivé krve (3-5 ml) byly navrstveny na Histopaque 1070 (Sigma) a lymfocyty byly odděleny centrifugací a promyty v chlazeném roztoku PBS. Celková buněčná RNA byla získána fenol-chloroformovou extrakcí v přítomnosti guanidiniumthiokyanátu [147]. Pokud nebylo možné provést izolaci RNA bezprostředně po odběru krve, byl použit odběrový systém PAX gene (Qiagen, SRN), který stabilizuje RNA. Do stabilizačního roztoku se odebírají 2 ml krve a izolace RNA se dále prováděla pomocí izolačního kitu dle návodu výrobce.

2.3 Kontrola koncentrace a kvality izolovaného genetického materiálu

Koncentrace a čistota izolovaného genetického materiálu (DNA, RNA) byla stanovena na základě měření absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm s korekcí na 320 nm na spektrofotometru LAMBDA Bio (PerkinElmer, Massachusetts, USA), později na

Nanodropu (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Integrita získaného genetického materiálu byla ověřena elektroforézou (aparatura SubCell; BioRad, California, USA) na 1% agarózovém gelu (UltraPure Agarose, Gibco BRL) barveném etidiumbromidem (Amresco, Ohio, USA) ve standardním TBE pufru 60 min při 75 V. DNA byla uchovávána v 1,5 ml zkumavkách při 4°C a skladována při –20°C, RNA byla uchovávána v hlubokomrazícím boxu při –80°C.

3. Příprava cDNA

Komplementární DNA (cDNA) byla získána reverzní transkripcí ze vzorků celkové buněčné RNA postupem podle výrobce kitu (Roche, Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Stručný postup: 1 μg RNA byl nejdříve inkubován se 100 ng náhodných hexanukleotidových primérů 10 min při 65°C. Ihned po inkubaci byl vzorek rychle zchlazen na ledu a následně byl ve 20 μl reakční směsi obsahující 1x RT-pufr (Roche), 10 mM DTT, 1 mM dNTP´s a 20 U Expand RT-transkriptázy (Roche) inkubována při 30°C 10 min a při 42°C 45 min. Získaná cDNA sloužila jako templát pro amplifikaci fragmentů kódujících oblastí genu *TP53*.

4. Design primérů

Primérové páry pro amplifikaci byly voleny o délce cca 20 mukleotidů tak, aby měly v páru přibližně shodné teploty tání. Pro přibližný výpočet T_m oligonukleotidů byl použit vztah:

$$Tm = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Priméry byly navrženy také s využitím softwaru AnnHyb *v*.4.936 (http://bioinformatics.org/annhyb), ve kterém byly optimalizovány i jejich další charakteristiky; např. vyloučení vzájemné komplementarity primérů eliminuje možnost tvorby jejich dimerů.

5. Mutační analýza genu *TP53*

Jako genetický materiál byla použita RNA, která byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA; pokud jsme neměli k dispozici vhodný vzorek RNA, byly jednotlivé exonové oblasti amplifikovány z genomové DNA. Celá kódující genová oblast byla analyzována sekvenováním produktů amplifikace PCR.

5.1 Amplifikace genu *TP53*

Kódující sekvence genu *TP53* byla z cDNA amplifikována v jednom 1333 bp dlouhém fragmentu. V případě DNA analýzy bylo amplifikováno 10 kódujících exonů genu *TP53* (exony 2-11) a sousedící intronové oblasti.

Amplifikace fragmentu z cDNA probíhala v 10 μl reakční směsi, která obsahovala 1x PCR pufr, 2 mM $MgCl_2$, 0,4 U FastStart Taq DNA polymerázy (Roche), 1 mM dNTPs (Applied Biosystems), 0,4 μM obou primérů a 1 μl cDNA. Reakce probíhala za následujících podmínek: 95°C_5 min, 35 cyklů (95°C_30 s, 60°C_30 s, 72°C_1 min 30 s) a závěrečná elongace 72°C_10 min. Priméry použité k amplifikaci fragmentu, který zahrnuje většinu kódující sekvence cDNA jsou v tabulce 5.

Amplifikace fragmentů genomové DNA probíhala ve shodné reakční směsi, která obsahovala 100 ng DNA. Amplifikační cyklus se skládal z iniciační denaturace při 95°C_3 min, po níž následovalo 40 cyklů (95°C_30 s, T_{an}_30 s, 72°C_50 s) a závěrečná elongace 10 min při 72°C. Priméry a podmínky amplifikace jednotlivých fragmentů genu *TP53* ukazuje tabulka 6.

***Tabulka 5**:* Priméry použité pro amplifikaci kódující oblasti genu *TP53*.

Fragment (poloha v cDNA)	Primér	Sekvence primérů 5´→3´	Délka fragmentu (bp)
1 (1-48_1182+106)	**RP01f**	GACACGCTTCCCTGGATTGGC	1333
	RP08r	CGCACACCTATTGCAAGCAAGG	
poloha priméru (670-690)	**SQ:RP04r**	GGTACAGTCAGAGCCAACCTC	
poloha priméru (563-583)	**SQ:RP05f**	TGGCCCCTCCTCAGCATCTTA	

Pozice v cDNA je označena podle referenční sekvence GenBank NM_000546, +1 odpovídá A v iniciačním kodónu ATG (exon 2). SQ:RP05f a SQ:RP04r jsou sekvenační priméry (f- forvard, r- reverse).

Tabulka 6: Priméry použité pro amplifikaci genu *TP53* z genomové DNA.

[1]Fragment (poloha v gDNA)	Páry Primérů	Sekvence primérů 5´→3´	T_{an} [°C]	Délka fragmentu (bp)
fr 1 (exon 2 a 3) (11632-12030)	**p40f** CCAGGTGACCCAGGGTTG **p41r/SQ** CGTTCCCCCTGACATCTACC		58	399
fr 2 (exon 4) (11984-12346)	**p42f** ACCTGGTCCTCTGACTGCTC **p43r/SQ** CGGTCCGTAACTTCAGAGTA		58	363
fr 3 (exon 5 a 6) (12984-13471)	**p44f/SQ** CCGTGTTCCAGTTGCTTTAT **p45r** AATTGGGGAGGAGGGTCT		58	488
fr 4 (exon 7) (13939-14239)	**p46f** TGCTTGCCACAGGTCTCC **p47r/SQ** GGCCTTTACACTACTCTCCA		58	301
fr 5 (exon 8 a 9) (14411-14821)	**p48f/SQ** TTCCTTACTGCCTCTTGCTT **p49r/SQ** TCTTTTGCCGTAAAACTCAC		58	411
fr 6 (exon 10) (17523-17740)	**p50A** CTCAGGTACTGTGAATATAC **p51r/SQ** GATACCGAAAGGTTGGATCCT		55	218
fr 7 (exon 11) (18567-18865)	**p52f** TCATCTCTCCTCCCTGCTTC **p53r/SQ** GTGTTGTTTTGTGGTCACG		58	299

[1]Úsek amplifikované genomové sekvence. Číslování vychází z genomové sekvence GenBank X54156. Primér, který byl použit k sekvenování je označen /SQ; (f – forwad, r – reverse); T_{an} – anelační teplota.

6. Mutační analýza genu *CHEK2*

V genu *CHEK2* jsme se soustředili na nejčastěji analyzovanou mutaci c.1100delC a na 5395 bp dlouhou deleci zahrnující exony 8 a 9, která byla nedávno prokázána v naší populaci. Mutace byly detekovány pomocí MLPA analýzy (kit P045) a při pozitivním výsledku byly ověřeny z genomové DNA pomocí PCR a sekvenování.

6.1 Detekce mutace c.1100delC - amplifikace specifického fragmentu DNA

Detekce delece c.1100delC genu *CHEK2* se provádí pomocí dvoustupňové amplifikace (nested-PCR), která umožňuje získat specifický genový fragment vhodný k následnému sekvenování (při jednostupňové amplifikaci je specifická sekvence kontaminována fragmenty pseudogenů) [148]. Priméry použité pro první a druhý stupeň amplifikace jsou uvedeny v tabulce 7.

Amplifikace fragmentu o 9194 bp v prvním stupni byla provedena pomocí long-range PCR (LR-PCR) s použitím Expand Long Template PCR (Roche) podle protokolu

výrobce. 15 μl reační směs obsahovala 1x PCR pufr, 0,4 μM priméry (CHK27f a CHK29r), 1,12 U polymerázové směsi (Expand Long Template Enzyme mix a 100 ng DNA. Následovala inkubace v termocykléru za podmínek: 94°C_2 min, 10 cyklů (94°C_10s, 61°C_30s, 68°C_7 min) a 21 cyklů (94°C_15s, 61°C_30s, 68°C_7 min) a závěrečná elongace 68°C_7 min.

Druhý stupeň amplifikace probíhal v 15 μl reakční směsi, která obsahovala 1x PCR pufr, 0,7 U FastStart Taq DNA polymerázy (Roche), 0,2 mM dNTPs, 0,4 μM priméry CHEK05f a CHEK04r a 1 μl produktu první amplifikace. Reakce probíhala za následujících podmínek: 95°C_5 min a 35 cyklů (95°C_30 s, 53°C_30 s, 72°C_50 s) a závěrečná elongace 72°C_7 min.

Tabulka 7: Priméry použité pro detekci mutace c.1100delC genu *CHEK2* pomocí nested-PCR.

[1]Fragment (poloha v DNA)	Páry primérů	Sekvence primérů 5´→3´	T_{an} [°C]	Délka fragmentu (bp)
1.PCR (exon 9 – intron 14) (44908_54101)	**CH27f**	TCTCAAGAAGAGGACTGTCTT	61	9194
	CHK29r	GCACAAAGCCCAGGTTCCATC		
2.PCR (intron 9 – 10) (45922_46185)	**CHEK05f**	TGGCAAGTTCAACATTATTCCC	53	264
	CHEK04r/SQ	ATTTGTGACTTCATCTAATCACCTCC		

[1]Úsek amplifikované genomové sekvence. Číslování vychází z genomové sekvence GenBank NG_011520.12 complement (8474298..8528391). Primér, který byl použit k sekvenování je označen /SQ; (f – forwad, r – reverse); T_{an} – anelační teplota.

6.2 Detekce delece exonů 8-9

Pro ověření rozsáhlé delece (del 5395) byla použita PCR reakce se třemi priméry (Tab. 8). Dva priméry ohraničující deletovanou oblast CHK08f a CHK09r amplifikují v případě deletované alely 1325 bp dlouhý fragment a priméry CHK08f a CHK10r (je v oblasti, která chybí v případě delece) amplifikují oblast pouze ze zdravé alely o délce 1195 bp.

Amplifikace probíhala v 15 μl reakční směsi, která obsahovala 1x PCR pufr, 2 mM $MgCl_2$, 0,7 U FastStart Taq DNA polymerázy, 0,2 mM dNTPs, 0,4 μM priméry a 100 ng DNA. Reakce probíhala za následujících podmínek: 95°C_5 min a 30 cyklů (95°C_30 s, 55°C_30 s, 72°C_1 min 30 s) a závěrečná elongace 72°C_10 min. Vizualizace fragmentů

byla provedena rozdělením na 1% agarosové elektroforéze a obarvením ethidiumbromidem. Přítomnost deletované alely byla ověřena sekvenováním.

Tabulka 8: Priméry použité pro ověření delece 5395 bp genu *CHEK2*.

[1]Fragment (poloha v DNA)	Priméry	Sekvence primérů 5´→3´	T_{an} [°C]	Délka fragmentu (bp)
(intron 7 – intron 9) (38911_45639)	**CHEK08f** **CHEK09r/SQ**	CTGTAGAACCACTATTTACATAAC AGTGTCTCAAACTTGGCTGCG	55	1335 (mut)
(intron 7) (38911_40110)	**CHEK08f** **CHEK10r**	CTGTAGAACCACTATTTACATAAC CAAGACACTGAAAGATACTC	55	1200 (wt)

Číslování v genomové DNA vychází z genomové sekvence GenBank NG_011520.12 complement (8474298..8528391). Primér, který byl použit k sekvenování je označen /SQ; (f – forwad, r – reverse); T_{an} – anelační teplota.

7. Automatické sekvenování

6 μl alikvoty PCR reakcí byly před sekvenováním zbaveny oligonukleotidů a deoxyribonukleosidfosfátů inkubací 15 min při 37°C s 0,8 μl enzymové směsi EXOSAP-IT (USB Corp., Cleveland, USA). Po následné 15 min inkubaci při 80°C vedoucí k inaktivaci enzymů byly reakční směsi doplněny o sekvenační primér – 0,2 μl 40 μM roztoku – a 2 μl směsi BigDye *v*.3.1 (Applied Biosystems) obsahující všechny komponenty nezbytné pro sekvenační reakci (včetně fluorescenčně značených ddNTPs). Podmínky sekvenační reakce byly: 95°C_2 min a 20 cyklů (95°C_ 5 s, 60°C_10 s, 72°C_4 min).

Produkty sekvenační reakce byly po přidání 1,3 μl 3 M Na-acetátu, 1,3 μl 0,125 M EDTA, pH 8,0 a 30 μl 99,9% etanolu precipitovány 10 minut při pokojové teplotě a centrifugovány 20 min při 14 000 rpm a při 4°C. Supernatant byl odsát a precipitát opláchnut 60 μl 70% etanolu; následná centrifugace proběhla za stejných podmínek. Po odstranění supernatantu byl precipitát inkubován v otevřených zkumavkách 5min při 90°C a 15min při pokojové teplotě. Precipitovaná DNA zbavená ethanolu byla rozpuštěna v HiDi formamidu, denaturována 4 min při 95°C a ihned ochlazena na 4°C. Takto připravené vzorky byly analyzovány v automatickém sekvenátoru ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) v 36 cm kapiláře na polymeru POP-7 za denaturujících podmínek a výsledky analýzy byly zpracovány pomocí programu Sequencing Analysis *v*.2.5.5 (Applied Biosystems).

8. Výpočet pravděpodobnosti nosičství mutace

U všech analyzovaných vzorků byla pomocí Mendelovského modelu BRCAPRO s výpočetním programem CancerGene *v*.5.0 (University of Texax Southwestern Medical Center; http://www4.utsouthwestern.edu/breasthealth/cagene) spočtena pravděpodobnost nosičství mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Výpočet umožnil retrospektivně porovnat četnost nalezených mutací s očekávanou frekvencí jejich výskytu.

9. MLPA analýza (Multiplex ligation-dependent probe amplification)

MLPA analýza byla testována na genu *DPYD* (OMIM 612779), který zaujímá na krátkém raménku chromozómu 1 (1p22) oblast čítající téměř 900 kilobazí [149]. Jeho 23 exonů kóduje enzym dihydropyrimidindehydrogenasu, který je hlavním účastníkem při degradaci uracilu a thyminu a uplatňuje se i při přeměně 5-fluorouracilu, který patří mezi nejčastější chemoterapeutika užívaná pro léčbu širokého spektra nádorových onemocnění. Mutace tohoto genu mohou enzym inaktivovat, což vede u pacienta k vyvinutí toxické reakce na podávané chemoterapeutikum. Většinu genových alterací představují bodové mutace. Nedávno však byla charakterizována fragilní genomovává oblast FRA1E zasahující přes 370 kb genu *DPYD*, která je náchylná ke zlomům během replikace a genová instabilita může vést ke genovým přestavbám [150].

DNA vzorky pacientů, kteří vyvinuli toxicitu při léčbě fluoropyrimidiny, jsme na přítomnost rozsáhlých delecí v genu *DPYD* testovali pomocí MLPA analýzy (SALSA MLPA kit P103; MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) [151]. Výsledky analýzy se jevily jako dobře reprodukovatelné a metoda byla následně dále využita i pro screening velkých delecí či duplikací v genech *BRCA1* (SALSA MLPA kit P002B a konfirmační kit P087) a *BRCA2* (kit P045). Analýza využívající MLPA kit P045 byla dále použita pro detekci dvou v naší populaci patrně nejčastějších alterací genu *CHEK2* (delece zasahující exony 8 a 9 a posunová mutace c.1100delC).

MLPA analýza je založena na principu multiplexní PCR a umožňuje relativní kvantifikaci jednotlivých exonů. Analýza proběhla dle instrukcí výrobce (www.MRC-holland.com) v reakčních směsích o poloviční objemu a amplifikované produkty byly separovány v genetickém analyzátoru ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Výsledný

elektroforeogram, s vrcholy odpovídajícími amplifikovaným exonovým nebo kontrolním fragmentům byl vyhodnocen jednak vizuálně, porovnáním výšek vrcholů jednotlivých elektroforeogramů a jednak porovnáním relativních ploch pod křivkou v doporučeném výpočetním programu Coffalyser *v*.8 (http://www.mlpa.com/coffalyser). Vzorky, obsahující exony snížené oproti referenčním hodnotám o více než 30% byly opětovně analyzovány (v případě genu *BRCA1* byl použit konfirmační kit P087). Poměr plochy vrcholu odpovídající určitému exonu vůči referenční hodnotě menší než 0,6 byl hodnocen jako delece; za duplikaci byl považován poměr větší než 1,4. U vzorků s jednoexonovou delecí byla sekvenováním vyloučena přítomnost sekvenčních variant, které by mohly ovlivňovat hybridizaci oligonukleotidových sond.

10. Oligonukleotidová aCGH (Oligonucleotide array-based CGH)

Pro lokalizaci bodů zlomu byla u rozsáhlých delecí přesahujících hranice genu *BRCA1* použita aCGH specifická pro chromozóm 17 (Roche NimbleGen, Madison, USA). Formát chipu byl 385K; medián vzdáleností mezi oligonukleotidovými sondami (50-ti až 75-ti mery) činila 160 bazí.

Testované vzorky i referenční DNA (ekvimolární směs vzorků DNA izolovaných od 100 náhodných dárců krve) byly fragmentovány sonifikací (průměrná délka fragmentů byla cca 500-2000 nukleotidů) a dále se postupovalo podle protokolu výrobce (Roche NimbleGen). Ve zkratce: 1 μg analyzované DNA byl označen fluorescenční barvou Cy3 a stejné množství referenční DNA bylo označeno barvou Cy5 za použití kitu Dual-Color DNA Labeling Kit (Roche NimbleGen). Označené vzorky DNA byly purifikovány, smíseny (6 μg každé značené DNA) a hybridizovány s oligonukleotidovými próbami na čipu po dobu 18 hodin při 42°C. Poté byly čipy omyty sérií promývacích roztoků. Po usušení byla fluorescence na mikročipu snímána skenerem Innoscan 700 (INNOPSYS, France) při rozlišení 3 μm. Výsledný obraz byl analyzován za použití doporučeného softwaru (Roche Nimblegen); fluorescenční signály byly normalizovány algoritmem qspline [152]. Analýza počtu kopií jednotlivých oligonukleotidových oblastí byla provedena algorytmem segMNT [153], který určil oblasti se statisticky významnou změnou. Výsledky byly vizualizovány použitím softwaru SignalMap *v*.1.9.0.03 (Roche NimbleGen).

11. Identifikace a charakterizace rozsáhlých přestaveb

Rozsáhlé genové delece nebo přestavby detekované MLPA analýzou byly potvrzeny a přesně charakterizovány na základě určení bodů zlomu na úrovni genomové DNA. Ve dvou případech (delece exonů 1-17 a 21-24), kdy delece výrazně přesahovaly hranice genu, bylo nutné zlomy nejprve přibližně lokalizovat pomocí aCGH specifické pro chromosom 17; v ostatních případech se podařilo amplifikovat genové fragmenty přiměřené délky obsahující deletovanou oblast. Následná sekvenační analýza amplifikovaných fragmentů pak umožnila přesné ohraničení deletované části genu. Pro amplifikaci úseku genu zahrnujícího deletovanou oblast se osvědčil kit Expand Long Template PCR Všechny (Roche Applied Science). Amplifikace byly provedeny v 10 μl reačních směsích, které obsahovaly 1x PCR pufr, 1,4 mM dNTPs, 0,4 μM priméry, 0,75 U polymerázové směsi (Expand Long Template Enzyme mix) a 100 ng DNA. Inkubace v termocykléru proběhla za podmínek: 92°C_2 min a 10 cyklů (92°C_10 s, T_{an}_30 s, 68°C_3 min) a 25 cyklů (92°C_15 s, T_{an}_30 s, 68°C_3 min + 10 s/cyklus) a závěrečná elongace 68°C_7min. Kratší fragmenty (do 1,5 kb) byly amplifikovány s FastStart Taq DNA polymerázou (Roche) za následujících podmínek: 95°C_3 min a 30 cyklů (95°C_30s, T_{an}_30s, 72°C_ 30 s až 1min pro fragmenty do 500 resp. 1000 bp).

Priméry ohraničující deletovanou oblast genu byly umístěny do sousedních nedeletovaných exonových sekvencí, pokud nebyly odděleny příliš dlouhými intronovými úseky. Pokud se jednalo o dříve popsanou alteraci (delece exonů 1-2, 5-14 nebo 21-22), pak jsme použili publikované priméry [104,105,123], případně byly navrženy priméry nové (v případě delece exonů 21-22 – viz. Tab.9). Priméry použité pro amplifikace a pro sekvenování jsou prezentovány v tabulce 9. Amplifikované PCR fragmenty byly rozděleny elektroforeticky v agarosovém gelu a po obarvení ethidium bromidem vizualizovány pod UV zářením. Za podmínek PCR reakce byly amplifikovány pouze aberantní, zkrácené fragmenty. Amplifikace fragmentů plné délky většinou není možná, protože delece obvykle zahrnovaly desítky tisíc nukleotidů. 2 μl alikvoty reakčních směsí obsahující deletované fragmenty byly zbaveny oligonukleotidů inkubací s 0,8 μl ExoSAP-IT. Sekvenační reakce pak byly doplněny vhodnými sekvenačními priméry – 0,2 μl 40 μM roztoku – a 2 μl směsi BigDye *v*.3.1.

Tabulka 9: Priméry použité pro LR-PCR a pro sekvenování fragmentů nesoucích deleci.

Postižené exony	Priméry	Sekvence priméru 5´→3´	T_{an} [°C]	Lokalizace fragentu* délka fragmentu (bp)	Reference
Δex 1-2	f/chr17/5 /SQ r2i	ACCTAAAATTCCTTCTGCTGGAC CAAAGAACGACTAACCTGGCA	55	[a]197249-235352 1170	[123]
Δex 1-17	f/chr17/4 /SQ r17i/2	TATCCCAGTGACTTTCCAGC TGAGAGGGATGGGAGAATAC	58	[a]208205-290011 1311	nová
Δex 5-10	f4i/3 BR11R6 /SQ	AGGCAGTCATGCATTAGTTTG CCGTCTCAGAAAATTCACAAG	57	[b]17563-33895 781+35	nová
Δex 5-14	f4i/1 r15i/1 SQ: r14i/2	CCTTACCTACCTACATTCAC CTTTATGTAGGATTCAGAGTA GAATCATCCCTATTGCCTGCC	54	[b] 19244-54463 3637	[104]
Δex 13-19	f12i/4 /SQ r19i/c	ACCAGTTTATGCTCTTCCAG GCCTATAAGATGCATTCCCT	57	[b]41617-67533 716	nová
Δex 18-22	17F1 23R2 SQ: f17i/3	GCTCGTGTACAAGTTTGCCAGA ATGGAAGCCATTGTCCTCTGTC AGGGTAGTGTTCATTGGAGC	63	[b]6140-81093 3738	nová
Δex 21-22	f20i/k 23R2 /SQ	TCAGAGGAGACAAGGAGCATG ATGGAAGCCATTGTCCTCTGTC	64	[b]71596-81093 216+236	[104,105]
Δex 21-24	f20i/j /SQ r24i/j /SQ	TTATCTCATAACTAGGCATCC TTCCTGAAAGTCCTCAGAGC	58	[b] 75369-101263 256+3	nová
dup 13	dup13F dup13R	GATTATTTCCCCCCAGGCTAC AGATCATTAGCAAGGACCTGTG	64	[b]50054-45092 1123	[118]

*číslování vychází se sekvence (a) NC_000017.9 complement (38300000..38760000) (b) L78833. SQ: - je označení pro sekvenační priméry (SQ: název priméru) nebo pro priméry, které sloužily zároveň pro LR-PCR i sekvenační reakci (název priméru /SQ), f (F) – forwad, r (R) – reverse. Priméry syntetizovala firma Generi Biotech, Hradec Králové, ČR; T_{an} –anelační teplota.

12. Názvosloví mutací

Pojmenování mutací vychází z doporučeného systému názvosloví, které vydala společnost Human Genome Variation Society (HGVS) [154]. Referenční sekvence pro pojmenování mutací jsou k dispozici v databázi GenBank (National Center for Biotechnology Informations, USA; http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Je-li templátem cDNA, pak platí, že číslem +1 je označován adenosin iniciačního kodónu ATG v referenční sekvenci pro kompletní cDNA daného genu. Číslování cDNA pro gen *TP53* je založeno na referenční sekvenci GenBank NM_000546, genomová DNA vychází z referenční sekvence GenBank X54156. Referenční sekvence použité pro popis mutací genu *CHEK2* byly použity referenční sekvence pro genomovou DNA GenBank NG_011520.12 complement (8474298..8528391) a pro kompletní kódující sekvenci GenBank NM_007194.3). K popisu rozsáhlých delecí a přestaveb je pro snazší orientaci a možnost srovnání

s literaturou použita tradiční nomenklatura podle referenční sekvence pro genomovou DNA genu *BRCA1* GenBank L78833; pro deleci exonů 1-17 and 1-2 byla použita referenční sekvence GenBank NC_000017.9 complement (38300000..38760000). Číslování kódující oblasti vychází z referenční sekvence pro *BRCA1* mRNA GenBank U33841. Pojmenování podle celochromozového číslování vychází z projektu UCSC Genome Browser on Human, NCBI Build 36.1, March 2006 assembly (hg 18; http://genome.ucsc.edu).

13. Analýza *BRCA1* haplotypů

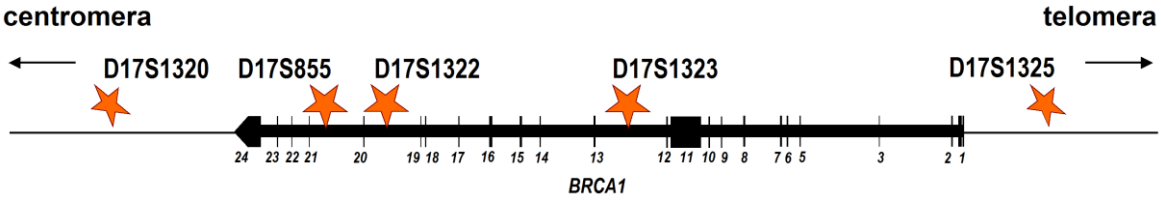
Pro určení haplotypu jsme využili analýzu mikrosatelitových markerů založenou na amplifikaci mikrosatelitových oblastí pomocí PCR a následné fragmentační analýze. S použitím fluorescenčně značených primérů je tato metoda rychlá a jednoduchá na obsluhu.

Jako mikrosatelity se označují jedno- až šestinukleotidové mnohonásobně se opakující sekvence DNA. Frekvence výskytu mikrosatelitů v lidském genomu je vysoká, průměrně jedenkrát na 30 - 100 kb genomové DNA, a pro svou vysokou heterozygozitu jsou vhodné pro haplotypovou analýzu [155].

Problémem analýzy mikrosatelitových markerů jsou takzvané stínové produkty (z anglického „stutter“ nebo „shadow bands“), které vzniknou většinou během PCR amplifikace [155]. Příčinou jejich vzniku může být nesprávné čtení Taq polymerázy nebo sekundární struktury DNA [156]. U heterozygota pro danou oblast mouhou stínové pásy jedné alely překrývat pásy druhé alely, což může znesnadnit analýzu. Tento fenomén je významný zejména u dlouhých dinukleotidových repetic [156].

Delece exonů 1-17 a 5-14 byly detekovány jako časté alterace genu *BRCA1*, které se specificky vyskytují v naší populaci. Dále byla detekována dvakrát delece exonů 21-22. Abychom zjistili, zda je příčinou poměrně vysoké četnosti těchto populačně specifických mutací tzv. founder efekt, analyzovali jsme u vzorků DNA pacientů s delecemi a kontrolních vzorků DNA (8 pacientů s karcinomem prsu bez mutace genu *BRCA1* (delece) a 20 náhodných dárců krve) mikrosatelity, které se nacházejí v blízkosti deletované oblasti. Tři z markerů byly intragenové (D17S855, D17S1322, D17S1322)

a další dva (D17S1320 a D17S1325), lokalizované směrem k centromeře, resp. k teloméře, nezasahovaly genovou oblast (Obrázek 8).



Obrázek 8: Umístění vyšetřovaných mikrosatelitových markerů vzhledem ke genu *BRCA1* (není dodrženo měřítko).

Mikrosatelity byly amplifikovány v 10 μl rekčních směsích, která obsahovaly: 1x PCR pufr, 0,2 mM dNTPs, 0,8 μM priméry, 0,4 U FastStart Taq DNA polymerázy (Roche) a 50-70 ng DNA. Reakce probíhala za následujících podmínek: 95°C_6 min, 30 cyklů (95°C_30 s, 58°C_30 s, 72°C_55 s) a závěrečná elongace 72°C_20 min. Priméry ohraničující jednotlivé oblasti a specifikace amlikonů jsou uvedeny v tabulce 10. Sekvence primérů byly převzaty z Genome Database (http://www.gdb.org). Forward priméry byly na 5' konci fluorescenčně značeny pomocí 6-FAM. Produkty amplifikace byly elektroforeticky rozděleny na 1,5% agarózovém gelu vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

Tabulka 10: Priméry pro amplifikaci mikrosatelitů a přibližná délka jednotlivých amplikonů.

[1]Marker (poloha v DNA)	Sekvence primérů 5'→3'	Jednotka repetice (bp)	Průměrná délka fragmentu (bp)
D17S855 (intron 20) (75856-76010)	GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG ACACAGACTTGTCCTACTGCC	2	143
D17S1320 (~416 kb za 3´ koncem *BRCA1*)	ACTTTCCAGAAAATCTCTGCTC CCACGTCTTTTCTGTGTTCC	2	180
D17S1322 (intron 19) (69171-69293)	GCAGGAAGCAGGAATGGAAC TCGTTCTG TTGCCCAGGCTAG	3	123
D17S1323 (intron 12) (42552-42705)	TAGGAGATGGATTATTGGTG AAGCAACTTTGCAATGAGTG	2	150
D17S1325 (~360 kb před 5´ koncem *BRCA1*)	AAAGGTGGCAATTCACAGTTG GTGATAAAACTCAGTGGTACTC	2	155

[1]Úsek amplifikované genomové sekvence. Číslování vychází z genomové sekvence GenBank L78833.

Fragmentační analýza byla provedena v genetickém analyzátoru ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Ke každému vzorku byl přidán fluorescenčně značený velikostní standard a velikost analyzovaných fragmentů byla softwarově dopočítána podle elučních časů vztažených ke standardům. PCR produkty byly 10x naředěny a 1 μl zředěného produktu byl smíchán s 9 μl HiDi formamidu a 0,3 μl velikostního standardu LIZ-600 Full (Applied Biosystems). Směs byla denaturována zahřátím na 95°C po dobu 4 min a následně byla okamžitě ochlazena na 3°C. Elektroforéza probíhala za denaturujících podmínek v 36 cm kapiláře na polymeru POP-7. Analýza a vizualizace dat byly provedeny s použitím programu GeneMapper *v*.4.0 (Applied Biosystems). Velikosti amplikonů z obou alel byly porovnány mezi sebou a vůči kontrolním vzorkům.

VÝSLEDKY

1. Charakteristika vyšetřovaného souboru a frekvence výskytu velkých přestaveb genů *BRCA1* a *BRCA2*

Ve skupině 740 vysoce rizikových pacientů byly nalezeny bodové mutace nebo krátké delece či inzerce v genu *BRCA1* v 15,7% případů (116/740) a v genu *BRCA2* v 5,1% případů (38/740) (Tab. 2 a 3) [100]. Soubor 586 pacientů s negativním mutačním nálezem byl dále testován na přítomnost rozsáhlých delecí či duplikací v těchto genech pomocí MLPA analýzy. Detekované přestavby, delece či duplikace a charakteristiky jednotlivých rodin jsou shrnuty v tabulce 11 a výsledky byly publikovány [157].

V celé skupině rizikových pacientů se nepodařilo zachytit žádné přestavby v oblasti genu *BRCA2*.

Naproti tomu rozsáhlé genomové přestavby různé délky (od méně než 4 kb do více než 80 kb) byly nalezeny v celém lokusu *BRCA1*. MLPA analýza odhalila 9 různých alterací u 16 (2,7%; 16/586) pacientů. Frekvence jejich výskytu v celé vyšetřované skupině 740 testovaných osob (zahrnující 154 pacientů s ostatními mutacemi genů *BRCA1/2*) byla 2,2% (16/740).

Pět různých alterací (delece exonů 1-17, 5-10, 13-19, 18-22 a 21-24) detekovaných v osmi rodinách bylo nových (obrázek 9, tabulka 11). Dvě zachycené mutace (delece exonů 1A až 2 a duplikace exonu 13) byly opakovaně prokázány v různých populacích [108,109]; dvě další (delece exonů 5-14 a 21-22) pak byly již dříve detekovány v české populaci [104,105].

Rozsáhlé alterace byly významně častější ve skupině pacientů s hereditární (familiární) formou postižení (14/276; 5,1%) ve srovnání se sporadickými (nefamiliárními) případy (2/310; 0,6%; P = 0,0008). Ve vysoce rizikových rodinách byla jejich četnost vyšší mezi pacienty z rodin s výskytem karcinomu prsu a ovaria nebo pouze karcinomu ovaria (7/90; 7,8%) než mezi pacienty z rodin pouze s výskytem karcinomu prsu (7/186; 3,8%; P = 0,16) (Tab. 12). Mezi případy s nefamiliární formou onemocnění byly zachyceny dvě dlouhé delece; delece exonů 5-14 u pacientky s medulárním karcinomem prsu diagnostikovaným ve věku 39 let a delece exonů 21-22 u pacientky s karcinomem prsu zachyceným ve věku 36 let.

Tabulka 11: Dědičné přestavby v genu *BRCA1*.

Exony	Genomové zlomy[a], pojmenování mutace dle gDNA[b/c] pojmenování mutace dle cDNA[d]	Předpokládaný efekt mutace	Rekombinace	Pacient No	BC & OC v rodině [e] (věk v době diagnózy)	Jiné tumory	Reference
1A-2	[a] chr17: 38,525,493-38,562,426 [d] c.1-32787_80+4067del36934 [b] g.197575_234508del36934	žádný transcript?	*ΨBRCA1*/*BRCA1*	779	BC (**58***); OC (**51***, 47)	-	[36,113,158]
1-17	[a] chr17:38,470,578-38,551,073 [d] c.1-21434_5075-1084del80496 [b] g.208928_289423del 80496	ztráta ~90% kódující sekvence	*Alu*Y/*Alu*Y	206 225 269 416	BC (**28**, 50, 50) BC (27); OC (**40**) BC (**35**, 36) BC (39. 62*); OC (**42**, 64*)	Tělo děložní (3x) Tlusté střevo,plíce - Lymfom	nová
5-10	[a] chr17:38,501,028-38,516,581 [d] c.135-4505_670+361del15552ins35 [c] g.17696_33247del 15552ins35	p.Lys45Asn fsX4	*Alu*Sx/*Alu*Y/*Alu*Jb	1190	BC (50, 50); OC (**46**)	-	nová
5-14	[a] chr17:38,480,980-38,512,561 [d] c.135-485_4485-913del31583 [c] g.21716_53298del31583	p.Lys45_Lys1495del	LINE/-	278 453 862 938	BC (**40/41**, 63, 69, 35/35) BC (**39**) BC (**44**, 48*); OC (60, 64*) BC (**32**, ?*, ?); OC (?*)	Pankreas,děloha - Prostata -	[104,113]
13	[a] chr17:38,483,825-38,489,905 [d] c.4186-1787_4358-1669dup6081 [c] g.44369_50449dup6081	p.Val1454Glu fsX7	*Alu*Sx/ *Alu*Sx	1388	BC (**59**), OC (57)	-	[118]
13-19	[a] chr17:38,467,226-38,492,424 [d] c.4185+4062_5193+1650del25201 [c] g.41850_67050del25201	p.Gln1396_Glu1731del	-/*Alu*Sx	571	BC (**56/56**, 48, 44)	-	nová
18-22	[a] chr17:38,454,318-38,470,629 [d] c.5075-1135_5046+347del16316 [c] g.63647_79962del16316	p.Asp1692Gly fsX27	*Alu*Y/*Alu*Sx	897	BC (**35**, 64,?,?,?,?)	-	nová

Tabulka 11: Dědičné přestavby v genu *BRCA1*.

Exony	Genomové zlomy[a], pojmenování mutace dle gDNA[b/c] pojmenování mutace dle cDNA[d]	Předpokládaný efekt mutace	Rekombinace	Pacient No	BC & OC v rodině [e] (věk v době diagnózy)	Jiné tumory	Reference
21-22	[a] chr17:38,453,374-38,457,152 [d] c.5278-492_5407-128del3779ins236 [c] g.77128_80906del3779ins236	p.Ile1760_Thr1802del	*Alu*Sx/*Alu*Jb	102 1293	OC (**<u>36</u>**) BC (**<u>41</u>**, ?,?)	- -	[104,105]
21-24	[a] chr17:38,433,150-38,458,787 [d] c.5278-2135_5592+18067del25639insTAG [c] g.75489_101127del25639 insTAG	žádný transcript? p.Ile1760fs	-/-	609	BC (**<u>38</u>**, ?,?)	-	nová

[a] Referenční sekvence pro chromozóm 17 je z databáze UCSC genome browser, Mar 2006; [b] Referenční sekvence překlenující analyzovaný úsek: GenBank NC_00017.9 complement (38300000..38760000); [c] Referenční sekvence: GenBank L78833.1; [d] číslování mutací: +1 odpovídá A z ATG iniciačního kodónu translace v referenční sekvenci U14680
BC (karcinom prsu), OC (karcinom ovaria) u probanda a u přímých příbuzných; věk v době diagnózy probanda je uvedený *tučně podtrženě*; hvězdička (*) označuje pacienta s BC i OC; věk v případě diagnózy bilaterálního karcinomu prsu je oddělen lomítkem (/); BC – karcinom prsu; OC – karcinom ovaria

Tabulka 12: Výskyt mutací a genomových přestaveb v lokusech *BRCA1/2* ve vztahu ke klasifikaci pacientů a rodin.

Klasifikace	Počet případů	Mutace *BRCA1* (%)	Mutace *BRCA2* (%)	Přestavby v testovaných rodinách (%)	Přestavby v rodinách negativně testovaných na mutace v *BRCA1/2* (%)
Hereditární případy	389	81 (20,8)	32 (8,2)	14 (3,6)	14/276 (5,1)
HBC	238	32 (13,4)	20 (8,4)	7 (2,9)	7/186 (3,8)
HBOC+ HOC	151	49 (32,5)	12 (7,9)	7 (4,6)	7/90 (7,8)
Sporadické případy	351	35 (10,0)	6 (1,7)	2 (0,6)	2/310 (0,6)
Celkem	740	116 (15,7)	38 (5,1)	16 (2,2)	16/586 (2,7)

HBC (hereditary breast cancer) syndrom dědičného karcinomu prsu, HBOC (hereditary breast and ovarian cancer) syndrom dědičného karcinomu prsu a ovaria; HOC (hereditary ovarian cancer) syndrom dědičného karcinomu ovaria

1.1 Určení pravděpodobnosti nosičství mutace pomocí programu BRCAPRO

Šestnáct rozsáhlých delecí, duplikací a přestaveb nalezených v genu *BRCA1* v 586 autonomních rodinách představovalo 12,1% (16/132) všech zachycených mutací tohoto genu (Tab. 12) v testované skupině pacientů. Za účelem ověření, zda počet nalezených mutací genu *BRCA1* skutečně odpovídá frekvenci jejich výskytu, byl použit program BRCAPRO umožňující retrospektivní odhad pravděpodobnosti nálezu zárodečných mutací genu *BRCA1*. Vypočítaná pravděpodobnost nosičství mutace v genu *BRCA1* byla jak pro celý soubor analyzovaných pacientů, tak pro podskupiny pacientů z rizikových rodin či sporadických případů, mírně nižší ve srovnání s detekovanými počty mutací (Tab. 13). Tento výsledek naznačuje, že počet mutací genu *BRCA1*, které mohly zůstat nedetekovány, nemůže být u testovaného souboru pacientů vysoký. Malé nesrovnalosti v počtech mutací mohou být například důsledkem toho, že program BRCAPRO může podhodnotit výskyt mutací, především u pacientů s nízkou pravděpodobností hereditárního postižení [144,159,160].

Tabulka 13: Průměrné predikované pravděpodobnosti nosičství mutace v genu *BRCA1* vypočítané pomocí BRCAPRO a jejich skutečný výskyt.

Klasifikace	Počet rodin/pacientů	Mutace v BRCA1 (%)	BRCAPRO průměr ±SD
Rodinný výskyt	389	95 (24,4)	0,217 ± 0,258
sporadické případy	351	37 (10,5)	0,087 ± 0,124
celkem	740	132 (17,8)	0,152 ± 0,213

2. Analýza a charakterizace rozsáhlých genomových přestaveb

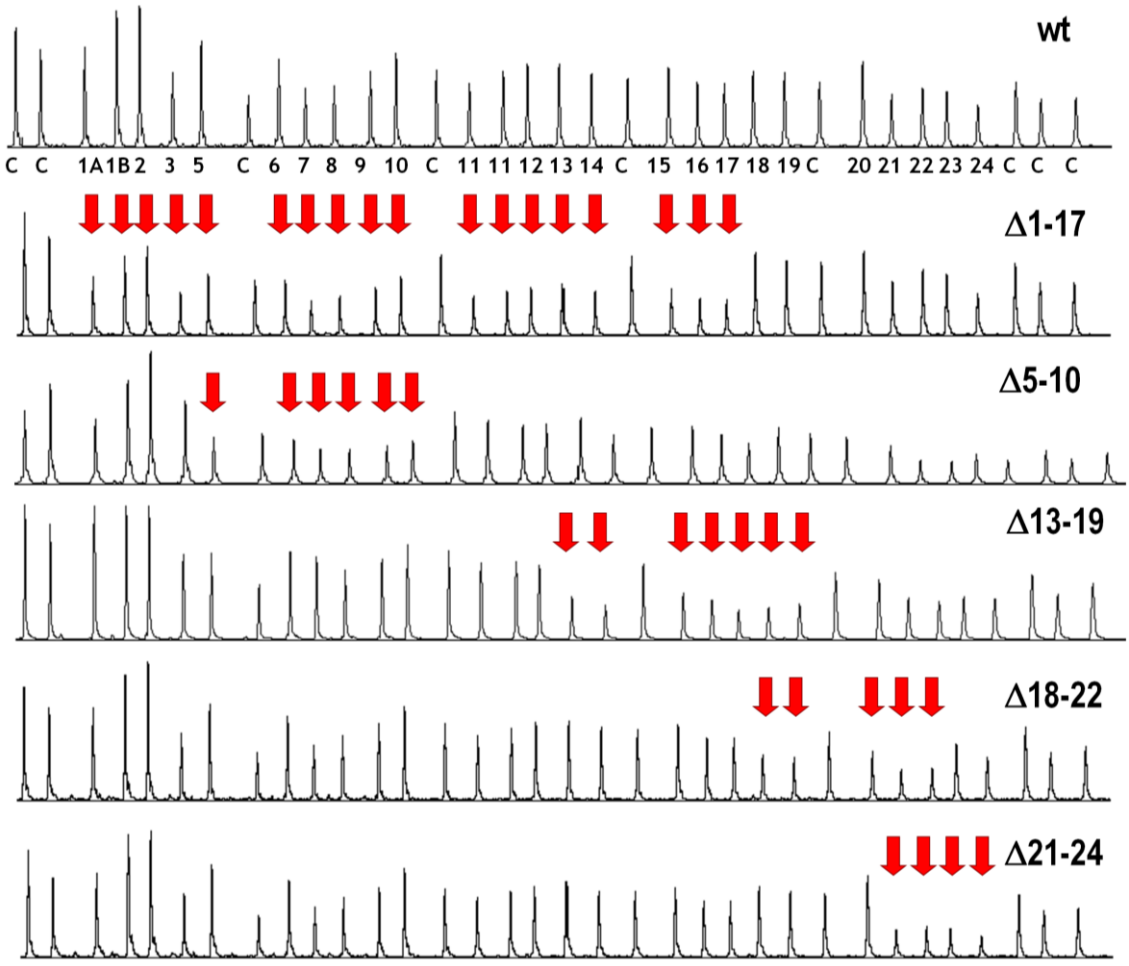
2.1 Detekce rozsáhlých genomových přestaveb

Rozsáhlé genomové delece, duplikace nebo přestavby se obvykle nezjistí analýzou DNA pomocí klasických PCR metod. Podobně i analýzy prováděné na úrovni cDNA nebývají úspěšné, protože nepostihují dlouhé delece často přesahující hranici genu. Například v naší skupině vyšetřovaných pacientů se podařilo analýzou cDNA zachytit

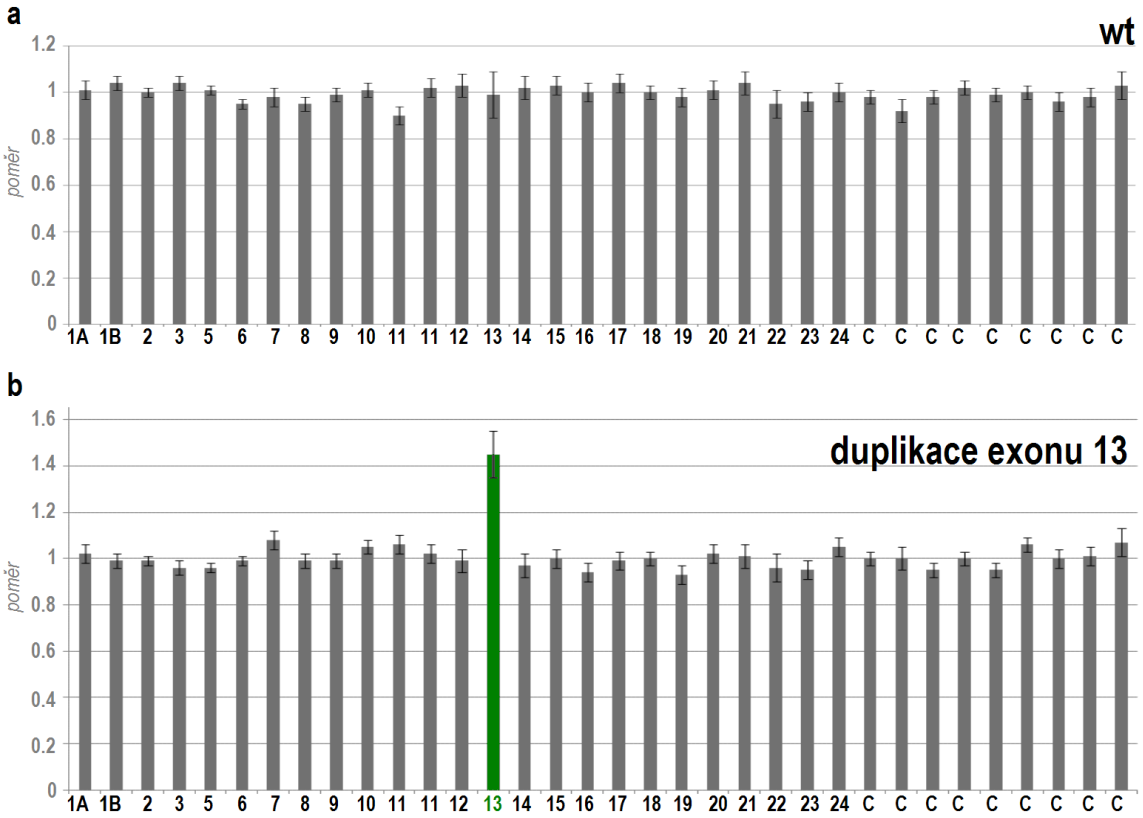
pouze jedinou přestavbu zasahující gen *BRCA1* [105]. Pro detekci dlouhých genových delecí a duplikací se v současnosti obvykle používá MLPA analýza.

2.1.1 MLPA analýza

Příklady výsledků MLPA analýzy provedené u 586 pacientů s negativní mutační analýzou genů *BRCA1* a *BRCA2* ukazují obrázky 9 a 10. Charakteristický elektroforeogram vzorku získaný na genetickém analyzátoru, kde jednotlivé křivky odpovídají exonům příslušného genu, se může hodnotit vizuálně na základě srovnání výšek vrcholů s vhodnými standardy (obrázek 9) nebo se vyhodnocení provede pomocí výpočetního programu Coffalyzer (obrázek 10), který lze zdarma získat na stránkách výrobce kitů MLPA (www.MRC-holland.com).



Obrázek 9: Pět nových delecí genu *BRCA1* detekovaných pomocí MLPA analýzy. Kontrolní vzorek je označen jako wt; kontrolní fragmenty DNA jako C; čísla označují jednotlivé exony genu *BRCA1*; šipky ukazují deletované exony

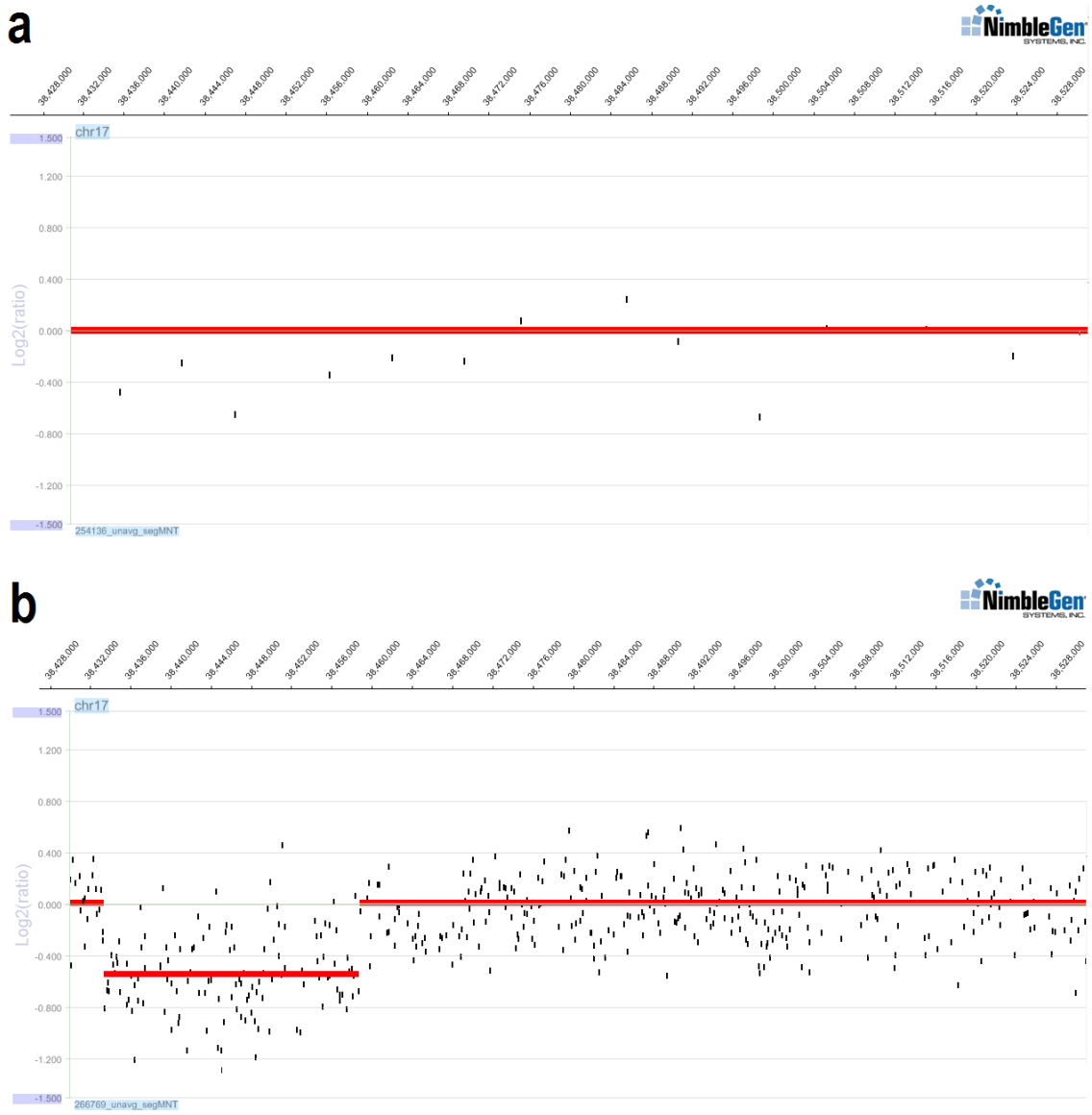


Obrázek 10: Duplikace exonu 13 detekovaná na základě vyhodnocení MLPA analýzy pomocí programu Coffalyzer. (**a**) kontrolní vzorek – wt; (**b**) vzorek No 1388 s duplikací exonu 13. Jednotlivé sloupce histogramu představují exony (označeny číslem) a kontrolní fragmenty (C); Poměr plochy křivky odpovídající příslušnému exonu vůči odpovídajícím křivkám všech vzorků je pro normální obraz blízký hodnotě jedna. Při exonové duplikaci se tento poměr obvykle zvyšuje nad 1,4.

2.1.2 Výběr mikročipu pro aCGH

V případě nově zachycených delecí přesahujících oblast genu (delece exonů 1-17 a 21-24) bylo nutné nejprve upřesnit hranice deletovaných oblastí pomocí oligonukleotidové aCGH analýzy. Teprve potom bylo možné amplifikovat spojovací fragment (tedy fragment nesoucí deleci) a provést sekvenační analýzu. Analýza aCGH specifická pro chromozóm 17 byla provedena na sklíčkách obsahujících oligonukleotidové sondy pokrývající celý chromozóm 17 s relativně vysokou hustotou pokrytí. Medián vzdáleností 385ti tisíc sond byl v tomto případě 160 bp. V případě vzorku 609 s genomovou delecí dlouhou 25,6 kb zasahující exony 21-24 byla použita aCGH na mikročipu specifickém pro chromozóm 17 i na celogenomovém mikročipu obsahujícím také 385 tisíc sond, které ovšem pokrývaly celý genom. Hustota sond je tedy u celogenomového čipu výrazně nižší – medián vzdáleností mezi jednotlivými próbami byl 7000 bp. Na obrázku 11 jsou znázorněny výsledky analyzovaných dat pro

oblast překlenující deletovaný úsek. Rozlišení celogenomového čipu je pravděpodobně menší díky nižší hustotě pokrytí sledovaného úseku. Z tohoto důvodu nebyla delece dlouhá 25,6 kilobazí na tomto čipu prokázána.



Obrázek 11: Ukázka SegMNT analýzy v programu SignalMap (Roche NimbleGen). Vzorek pacientky No 609 s 25639 bp dlouhou delecí zasahující exony 21-24 byl testován pomocí aCGH na celogenomovém mikročipu (**a**) a mikročipu specifickém pro chromozóm 17 (**b**). Oba čipy obsahovaly 385 tisíc sond. Osa *y* představuje log2 poměru fluorescenčních intenzit Cy5/Cy3. Na ose *x* jsou formou *protáhlých teček* znázorněny pozice sond pokrývajících danou oblast. *Červené čáry* jsou výsledkem segMNT analýzy. Snížení červené čáry (reflektující snížení poměru Cy5/Cy3) odpovídá deletované oblasti. Znázorněná oblast odpovídá *BRCA1* lokusu. Celochromozómové číslovaní je podle UCSC genome browser, Mar 2006.

2.2 Charakterizace rozsáhlých přestaveb a určení bodů zlomu

Pozitivní nález pomocí MLPA analýzy je nutné ověřit (u genu *BRCA1* pomocí sady kontrolních sond alternativního kitu). Dále je nezbytné určit rozsah delece, případně

povahu genomové přestavby. MLPA může například poskytnout informaci o posunu čtecího rámce, či o expresi alterovaného genu (např. při postižení promotorové oblasti nebo sekvence obsahující polyadenylační signál může být blokována genová exprese) a tedy i o případné patogenitě příslušné mutace. Long-Range PCR (LR-PCR) obvykle slouží k amplifikaci aberantního fragmentu (spojovací fragment), který obsahuje deletovaný úsek genu, a následně se analyzuje sekvenováním. Ve vzorcích, které jsme analyzovali, byl ve všech případech amplifikován pouze aberantní fragment nesoucí deletovanou sekvenci. Naopak amplifikace příslušného genového úseku z normální alely nebyla vzhledem k jeho délce a podmínkám PCR možná.

Charakterizace pěti nově popsaných alterací je ukázána na obrázcích 9, 12, 13 a 14. Popis alterací a mechanismus vzniku přestaveb je uveden v tabulce 11.

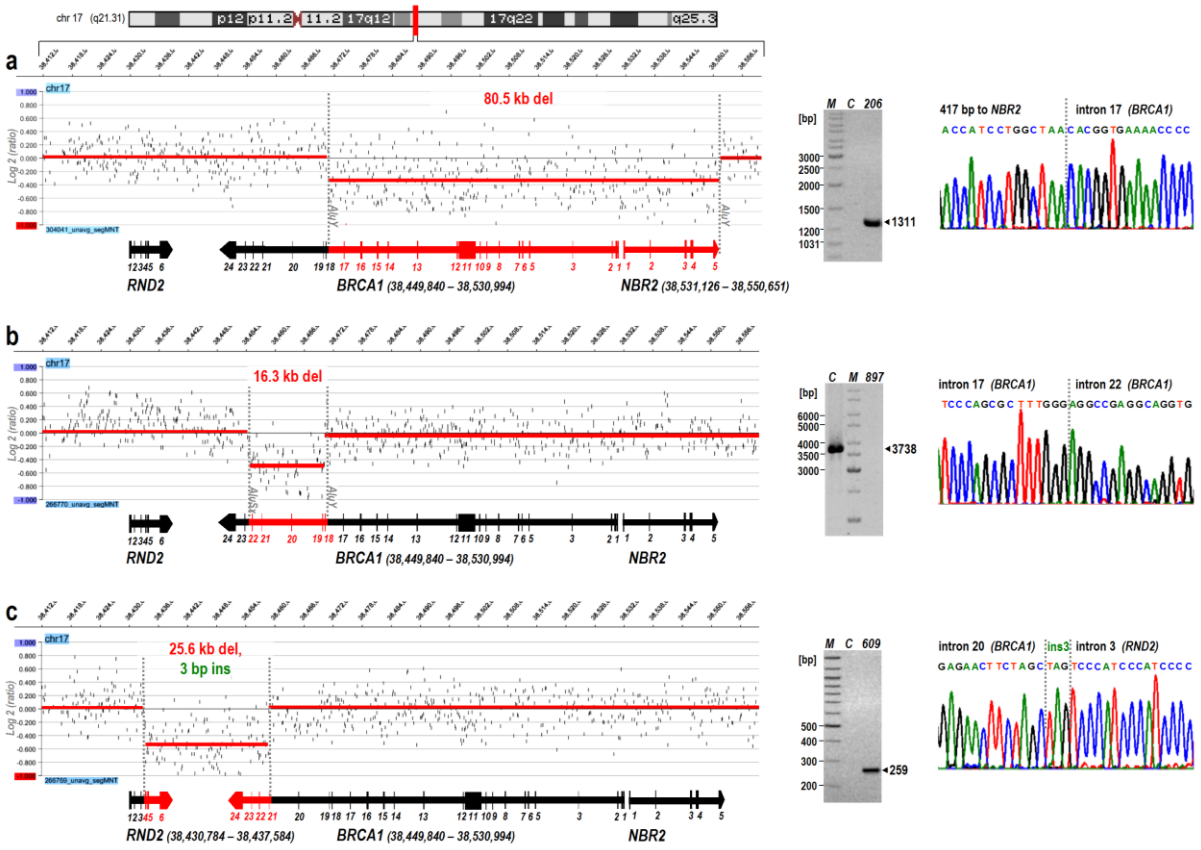
V případě nových delecí přesahujících oblast genu (delece exonů 1-17 a 21-24) předcházela LR-PCR a sekvenování fragmentu oligonukleotidová aCGH analýza (Obr. 12).

Delece exonů 1A-2 byla detekována u pacientky s diagnostikovaným karcinomem prsu i ovaria z HBOC rodiny. Sekvenační analýza LR-PCR produktu ohraničeného priméry navrženými Preisler-Adamsovou a spol. [123] odhalila deleci 36934 bp (GenBank NC_00017.9 complement (38300000..38760000): g.197575_234508del36934). Body zlomu již byly popsány u identických mutací nalezených v USA [36] , Itálii [158] a Německu [113] a nacházejí se v intronu 2 genu *ΨBRCA1* (téměř 33 kilobazí před iniciačním kodónem pro translaci *BRCA1*) a v intronu 2 genu *BRCA1* v plně homologních úsecích dlouhých 237 bp. Delece zasahuje kromě prvních dvou exonů genu *BRCA1* také celý gen *NBR2*, který je lokalizován v oblasti mezi *BRCA1* a *ΨBRCA1* (Obr. 3). Vzhledem k tomu, že delece zasahuje promotorovou oblast genu *BRCA1*, nedochází pravděpodobně k transkripci postižené alely [35,36].

Delece exonů 5-14 byla popsána u dvou vysoce rizikových HBOC rodin, jedné HBC rodiny se šesti případy karcinomu prsu (včetně 2 bilaterálních karcinomů prsu) a u jedné pacientky s medulárním karcinomem prsu bez rodinného výskytu karcinom prsu a ovaria. LR-PCR a následné sekvenování potvrdilo ve všech 4 případech stejnou deleci 31583 nukleotidů (GenBank L78833: g.21716_53298del31583). Tato delece vede k výpadku 1450 aminokyselin bez posunu čtecího rámce. Totožná alterace byla popsána u 4 pacientů z Moravy [104] a jednoho z Německa [113].

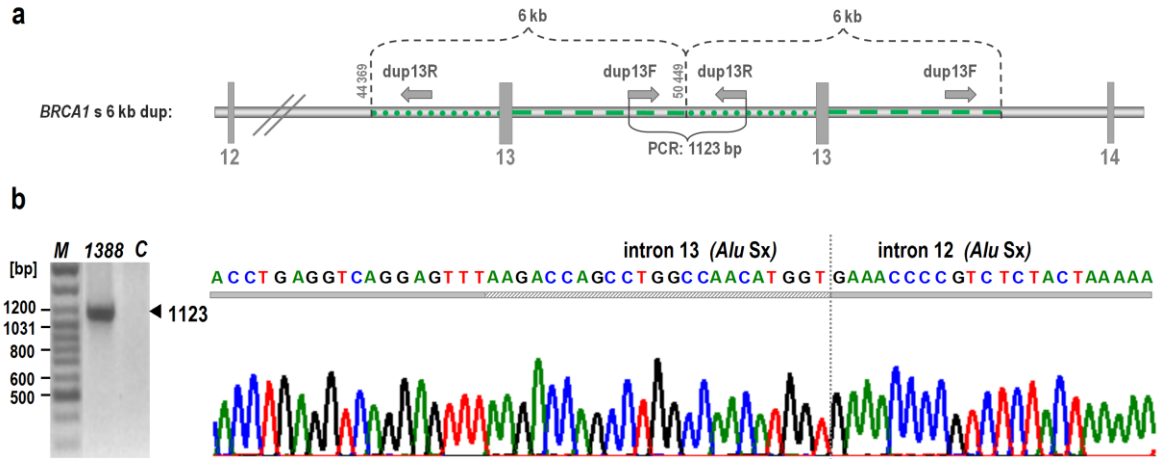
Delece exonů 21-22 byla popsána v naší laboratoři při analýze cDNA, prováděné v rámci mutační analýzy genu *BRCA1* [105]. Delece exonů 21 a 22 není spojena

s posunem čtecího rámce. Jedná se o přestavbu, kde v místě zlomu dojde k výpadku 3779 bp a současné inzerci 236 nukleotidů (GenBank L78833: 77128_80906del3779ins236). Shodná alterace byla později nalezena u rodiny se třemi případy karcinomu prsu. Mutace byla rovněž popsána u dvou rodin na Moravě [104].



Obrázek 12: Charakterizace a určení bodů zlomu dlouhých delecí v genu *BRCA1* pomocí aCGH specifické pro chromozóm 17, LR-PCR a sekvenování.
Vlevo – analýza počtu kopií v lokusu *BRCA1* pomocí aCGH. Osa *y* představuje log2 poměru fluorescenčních intenzit Cy5/Cy3. Na ose *x* jsou formou spotů znázorněny pozice sond. *Červené čáry* jsou výsledkem segMNT analýzy. Snížení červené čáry (tj. snížení intenzity poměru barviček Cy5/Cy3) odpovídá deletované oblasti. Pod výsledky analýzy je *tlustými šipkami* znázorněna pozice a orientace genů *BRCA1*, *NBR2* a *RND2* a *čevená část šipek* představuje deletované oblasti genů. Celochromozómové číslovaní je podle UCSC genome browser, Mar 2006.
Vpravo – separace PCR fragmentů v agarosovém gelu a potvrzení delece sekvenováním. Nosiči delece jsou označeny číslem; M – velikostní marker; C – kontrolní vzorek DNA; body zlomu jsou označeny *přerušovanou čárou*, pokud se body zlomu nacházejí v *Alu* repetitivní oblasti, pak je to vyznačeno v levé části schématu.
(**a**) 80,5 kb dlouhá delece zasahující exony 1-17 a celý gen *NBR2*, ke zlomu došlo v repetitivních oblastech (*Alu*),
(**b**) 16,3 kb dlouhá delece zahrnující exony 18-22, ke zlomu došlo v repetitivních oblastech (*Alu*),
(**c**) rozsáhlá přestavba zahrnující deleci 25,6 kb zasahující exony 21-24 a poslední 3 exony genu *RND2* a inzerci tří nukleotidů v místě delece.

U jedné pacientky No 1388 s karcinomem prsu z HBOC rodiny byla MLPA analýzou detekována duplikace exonu 13 (Obr. 10). S použitím publikovaných primérů [118] byl pomocí PCR amplifikován 1123 pb dlouhý fragment specifický pro duplikovanou oblast, jehož sekvenační analýza odhalila duplikaci 6081 bp dlouhé oblasti zahrnující celý exon 13 (GenBank L78833: g.44369-50449dup6081) (Obr. 13). Body zlomu se nacházejí ve 23 bp dlouhém úseku dvou stejně orientovaných sekvencí *Alu*Sx (44346-44368 a 50427-50450) s identickým nukleotidovým pořadím. Stejná duplikace byla poprvé popsána ve třech amerických rodinách se smíšeným evropským původem (anglický, holandský, irský) [118] a později v dalších evropských populacích [119,161]. Tato duplikace pravděpodobně vede k posunu čtecího rámce a k předčasnému ukončení translace (p.Val1454Glu fsX7).

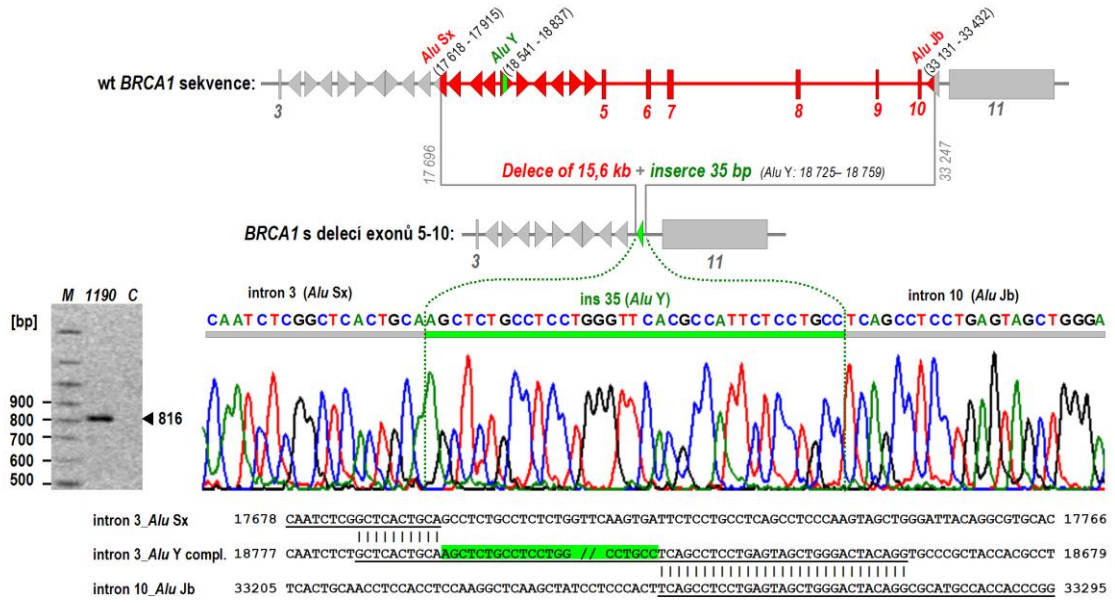


Obrázek 13: Charakterizace 6 kb dlouhé duplikace a určení míst zlomu. (**a**) Schématické znázornění části genu *BRCA1* s 6081 bp dlouhou tandemovou duplikací zahrnující exon 13 (Převzato ze [118]). *Šipky* znázorňují polohu a směr primérů, *svislé obdélníky* znázorňují exony, *vodorovný obdélník* představuje dvouvlákno DNA. (**b**) Long range PCR s priméry dup13F a dup13R, které amplifikují specifický fragment pouze z alely nesoucí duplikaci (vlevo) a sekvenační analýza aberantního PCR fragmentu o délce 1123 bp (vpravo). Místo zlomu je vyznačeno *přerušovanou čárou*. Shodné nukleotidové pořadí (23 bp) sekvencí *AluSx* v intronu 12 a 13, kde dochází k rekombinaci je podtrženo *šrafovaným obdélníkem*. Nosič mutace je označen číslem, C – negativní kontrolní vzorek DNA, M – velikostní marker.

Další popsané přestavby nebyly dosud popsány. Delece zasahující exony 1-17 byla identifikována ve 2 HBC a 2 HBOC rodinách. Lokalizaci delece, která je nutnou podmínkou pro amplifikaci vhodného fragmentu zahrnujícího deletovaný úsek DNA, umožnila chromozóm 17 specifická aCGH (Obr. 12). S navrženými primery (z každé strany deletovaného úseku DNA) byl pomocí LR-PCR amplifikován aberantní fragment o délce 1311 bp. Jeho sekvenováním byla ověřena delece 80496 bp (GenBank

NC_00017.9 complement (38300000..38760000): g.208928_289423del80496) ve všech čtyřech rodinách. Zlomy delece se nacházejí v 37 bp dlouhém úseku identických sekvencí dvou *Alu*Y repetic; jedna je lokalizovaná více než 20 kilobazí před iniciačním kodónem *BRCA1* a druhá v intronu 17 genu *BRCA1*. Tato delece zasahuje více jak 90% kódující sekvence *BRCA1* a celý sousedící gen *NBR2*. Delece exonů 1-17 byla popsána také ve Švédsku [126], avšak pro deleci dlouhou 284479 bp byly identifikovány odlišné body zlomu; jeden též v intronu 17 a druhý více než 200 kilobazí před iniciačním kodónem genu *BRCA1*.

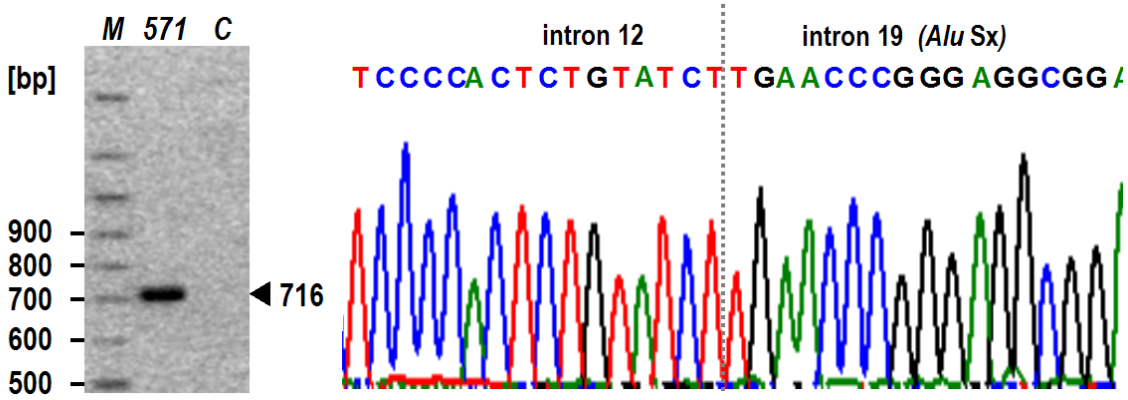
U pacientky z HBOC rodiny No 1190 byla charakterizována komlexní přestavba zahrnující deleci exonů 5-10 a krátkou inzerci v místě zlomu odvozenou pravděpodobně z repetitivní sekvence v intronu 3 genu *BRCA1* (Obr. 14). S priméry navrženými v intronu 3 a 10 byl amplifikován fragment 816 bp. Sekvenování odhalilo deleci 15552 bp a současnou inzerci 35 bp (GenBank L78833: g.17696_33247del 15552ins35). Hranice delece se nacházejí v repetitivních sekvencích *Alu*Sx a *Alu*Jb v intronech 3 a 10. Vložený úsek je reverzní komplement sekvence odvozené od *Alu*Y repetice v exonu 3. Místa zlomu byla lokalizována v repeticích *Alu*Sx (g.17686-17695) a *Alu*Y (g.18760-18769) v intronu 3 obsahujících 10 identických nukleotidů a v repeticích *Alu*Y (g.18696-18724) a *Alu*Jb (g.33248-33276) v intronech 3 a 10 obsahujících 29 identických nukleotidů (Obr. 14 dole). Předpokládaný efekt ztráty exonů 5-10 je posun čtecího rámce a zkrácení finálního proteinového produktu BRCA1 (p.Lys45Asn fsX4).



Obrázek 14: Charakterizace a určení bodů zlomu u komplexní genomové přestavby zahrnující deleci exonů 5-10 a inzerci 35 nukleotidů pomocí LR-PCR a sekvenování. Body zlomu ověřené sekvenováním jsou označeny *zelenou přerušovanou čárou*
Horní část – deletovaná oblast (neodpovídá měřítku) je označena *červeně*, nedeletovaný úsek *šedě*; exony jsou znázorněny jako *obdélníky*; pozice a orientace *Alu* sekvencí jsou vyznačeny *šipkou*. *Alu* sekvence, které se účastní přestavby jsou označeny popiskem (GenBank L78833.1).
Dolní část – separace PCR fragmentů v agarosovém gelu ***(vlevo)*** a potvrzení delece a inzerce sekvenováním ***(vpravo)***. Proband – označen číslem; M – velikostní marker; C – kontrolní vzorek DNA. Místa zlomů detekovaná sekvenováním jsou označena *zelenou tečkovanou čárou*. Dolní část schématu ukazuje sekvence sousedící s místy zlomu. Identické sekvence kde dochází k rekombinacím jsou označeny vertikálními čárami. Inzert (35 bp), který pochází z *Alu*Y (L78833.1: 18541-18837), je zvýrazněn silnou zelenou čárou. Sekvence znázorňující spojovací fragment vzniklý homologní rekombinací je *podtržená*.

Delece zasahující exony 13-19 byla identifikována u pacientky No 571 s bilaterálním karcinomem prsu z HBC rodiny. Priméry navržené dle sekvencí v intronu 12 a 19 byly použity pro amplifikaci 716 bp dlouhého LR-PCR fragmentu (Obr. 15), jehož sekvenováním byla odhalena delece 25201 bp (GenBank L78833: g.41850_67050del25201). Delece nevede k posunu čtecího rámce (p.Gln1396_Glu1731del), avšak ztráta 336 aminokyselin je pravděpodobně patogenní.

Deletovaná oblast zahrnuje podstatnou část funkční domény BRCT (aminokyselinové zbytky 1646-1859) [162], což negativně ovlivňuje účast BRCA1 v regulaci buněčného cyklu a reparaci DNA [163]. V BRCT doméně byla popsána řada missense a nonsense mutací v rodinách s karcinomem prsu [164,165].



Obrázek 15: Charakterizace a určení bodů zlomu delece zahrnující exony 13-19 pomocí LR-PCR a sekvenování. ***Vlevo*** – separace produktu amplifikace v agarosovém gelu. Nosič delece je označen číslem; M – velikostní marker; C – kontrolní vzorek DNA. ***Vpravo*** – Charakterizace delece sekvenováním. Místa zlomů potvrzená sekvenováním jsou označena *tečkovanou čárou*.

Delece exonů 18-22 byla odhalena u pacientky No 897 z HBC rodiny se šesti případy karcinomu prsu. LR-PCR s priméry lokalizovanými v exonech 17 a 23 amplifikovala specifický fragment dlouhý 3738 bp (Obr. 12), jehož sekvenování prokázalo deleci 16316 bp (GenBank L78833: g.63647_79962del16316) a ukázalo, že k rekombinaci došlo mezi vysoce homologními sekvencemi *Alu*Y v intronu 17 a *Alu*Sx v intronu 22. Popsaná delece vede k posunu čtecího rámce a k translaci zkráceného proteinu (p.Asp1692Gly fsX27). Vzorek DNA analyzované pacientky byl použit jako pozitivní kontrola pro testování chromozóm specifické aCGH analýzy (Obr. 12).

Delece exonů 21-24 genu *BRCA1* byla odhalena u ženy No 609 s invazivním karcinomem prsu z HBC rodiny. Pomocí aCGH analýzy na čipu specifickém pro chromozóm 17 byla lokalizována místa zlomů v intronu 20 a v oblasti vzdálené asi 18 kb od stop kodónu genu *BRCA1* (Obr.12). S navrženými priméry byl amplifikován aberantní fragment o délce 259 bp. Sekvenační analýza prokázala deleci 25639 nukleotidů a současnou inzerci trinukleotidu TAG (GenBank L78833: g.75489_101127del25639 insTAG). Zlomy delece se nacházely v intronu 20 a v místě vzdáleném asi 18 kilobazí od stop kodónu genu *BRCA1*. V tomto případě dochází atypicky k rekombinaci nehomologních DNA sekvencí.

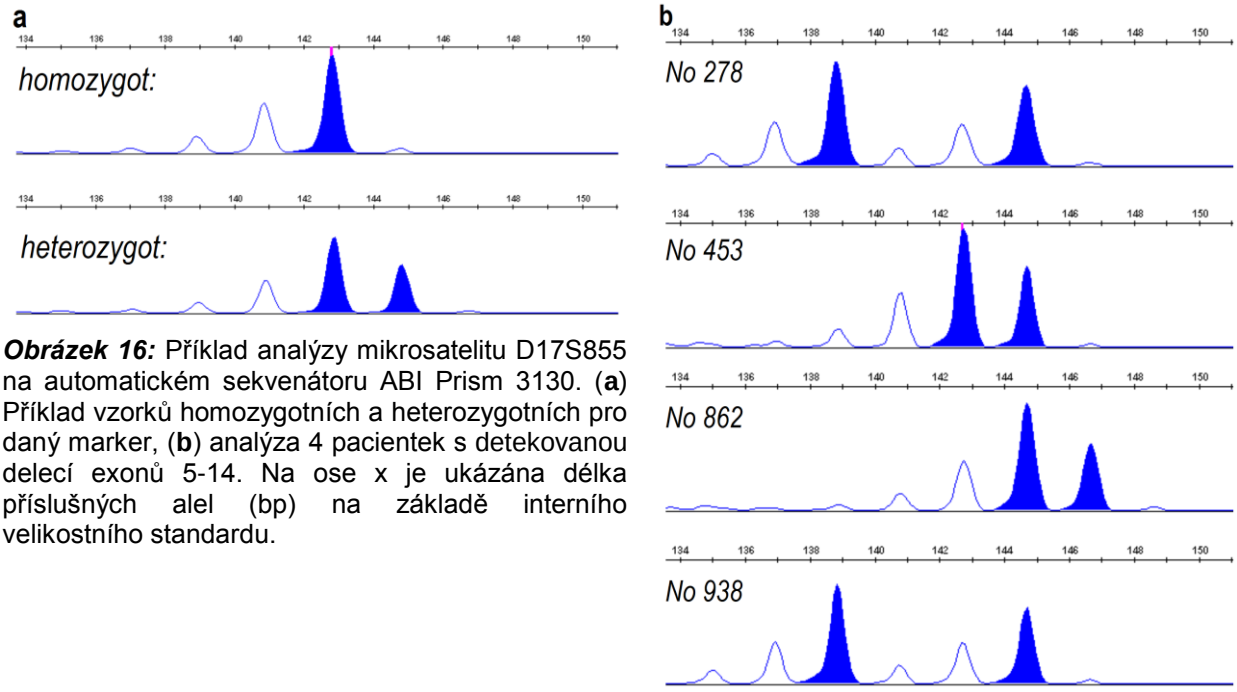
Podobná delece byla popsána v USA u rodiny irského původu [71], avšak jednalo se o deleci 19245 bp, která vznikla následkem homologní rekombinace mezi dvěma repetitivními *Alu* oblastmi.

Nosička mutace byla ve všech polymorfních místech kódující oblasti homozygotem a nebylo tedy možné studovat expresi jednotlivých alel. Byla však popsána monoalelická

exprese genu *BRCA1* u pacientů s delecí zahrnující exon 24 [113,166]. Mutantní alela je pravděpodobně degradována v procesu tzv. nonsense-mediated decay v důsledku ztráty polyA konce a 3´ nepřekládané oblasti genu [113,166]. Proto předpokládáme, že i v případě delece exonů 21-24, u které také dochází ke ztrátě polyA konce a 3´ nepřekládané oblasti, nedochází k přepisu deletované alely do sekvence mRNA. Pro patogenitu mutace rovněž svědčí fakt, že 104 deletovaných koncových aminokyselin představuje podstatnou část BRCT domény BRCA1 proteinu, která je významná pro regulaci buněčného cyklu a reparaci DNA [163] a, jak již bylo řečeno výše, u delece exonů 13-19, byla popsána řada mutací této domény, které zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu [164,165].

2.3 Analýza *BRCA1* haplotypů

Polovinu z 16 nalezených přestaveb genu *BRCA1* tvořily dvě alterace (delece exonů 1-17 a 5-14), z nichž každá byla detekována ve čtyřech rodinách, a delece 21-22 byla detekována ve dvou dalších rodinách. K posouzení, zda tyto opakující se mutace představují populačně specifické mutace (founder mutace), byla v příslušných rodinách provedena haplotypová analýza s intragenovými a v blízkosti genu ležícími mikrosatelity. Příklad fragmentační analýzy mikrosatelitů je uveden na obrázku 16.



Obrázek 16: Příklad analýzy mikrosatelitu D17S855 na automatickém sekvenátoru ABI Prism 3130. (**a**) Příklad vzorků homozygotních a heterozygotních pro daný marker, (**b**) analýza 4 pacientek s detekovanou delecí exonů 5-14. Na ose x je ukázána délka příslušných alel (bp) na základě interního velikostního standardu.

Analýzy provedené u pacientů z jednotlivých rodin ukázaly, že nosiči stejné alterace sdíleli společný ~ 857 kb haplotyp definovaný mikrosatelity D17S855, D17S1322, D17S1320 a D17S1325, což naznačuje společný původ pro každou mutaci. Naopak tyto haplotypy nebyly nalezeny u žádného z 20 kontrolních vzorků. Analýzu haplotypů u jednotlivých pacientů ukazuje (Tab. 14).

Tabulka 14: Spojení haplotypu s delecí exonů 1-17, 5-14 a 21-22.

	Pacient No	**D17S1325**	**D17S1322**	**D17S855**	**D17S1320**
Del ex 1-17	206	[a]**185** 193	**115** 124	**147** 139	**167** 171
	225	**185** 191	**115** 115	**147** 145	**167** 173
	269	**185** 193	**115** 115	**147** 141	**167** 173
	416	**185** 191	**115** 115	**147** 145	**167** 169
Del ex 5-14	278	**191** 187	**115** 121	**145** 139	**173** 160
	453	**191** 199	**115** 118	**145** 143	**173** 173
	862	**191** 193	**115** 115	**145** 147	**173** 169
	938	**191** 205	**115** 118	**145** 139	**173** 179
	Pacient No	**D17S1325**	**D17S1322**	**D17S1323**	**D17S1320**
Del ex 21-22	102	**193** 201	**115** 119	**149** 153	**173** 173
	1293	**193** 193	**115** 115	**149** 149	**173** 169

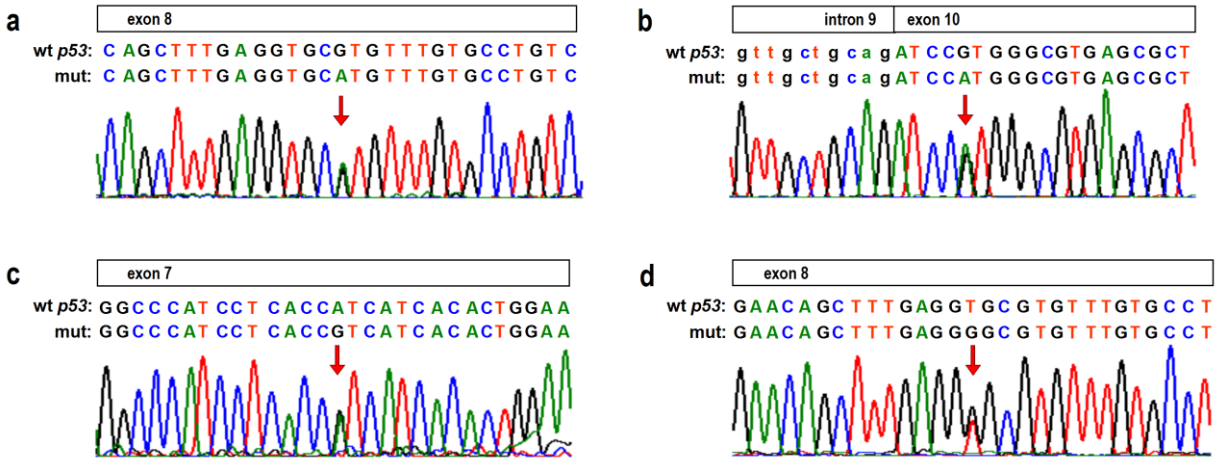
[a] čísla ukazují velikosti mikrosatelitových markerů (bp)

3. Mutační analýza genu *TP53*

U pacientů s negativním výsledkem rutinního vyšetření mutací v genech *BRCA1/2* jsme se dále zaměřili na analýzu genu *TP53*, který rovněž patří mezi vysoce penetrantní predispoziční geny u hereditárního karcinomu prsu a ovaria.

U 586 analyzovaných osob byly v genu *TP53* zachyceny 4 jednonukleotidové substituce (Obr. 17). Jejich charakterizace a specifikace postižených rodin jsou uvedeny v tabulce 15. Ve všech případech se jednalo o missense mutace vedoucí k aminokyselinové záměně. Všechny, kromě c.998G>A, jsou uvedeny v databázi mutací genu *TP53* IARC (http://www-p53.iarc.fr) a byly detekovány jako somatické mutace u pacientek s karcinomem prsu [167]. Pouze mutace c.818G>A vedoucí k záměně aminokyseliny v kodónu 273 (p.Arg273His) je rovněž vedena jako zárodečná mutace [167]. Mutace p.Ile254Val, p.Val272Gly a p.Arg273His se nacházejí v DNA vazebné doméně; mutace vedoucí k záměně aminokyseliny v 333 kodónu (p.Arg333His) je lokalizována v tetramerizační doméně, která se nachází na C-konci proteinu a je nezbytná pro oligomerizaci a vznik funkčního tetraméru.

Mutace c.815T>G, která byla detekována u pacientky z HBC rodiny s karcinomem prsu diagnostikovaným ve věku 27 let, je na seznamu patogenních mutací genu *TP53*. Podobně je pravděpodobně patogenní i mutace c.818G>A zachycená u pacientky, u níž byl diagnostikován karcinom prsu ve věku 28 let, jejíž matka onemocněla karcinomem prsu ve 30 letech. Jedná se o častou genovou variantu detekovanou v nádorové tkáni u pacientek s karcinomem prsu.



Obrázek 17: Potvrzení missense mutací v genu *TP53* sekvenováním fragmentů PCR amplifikovaných na genomové DNA.
(**a**) Pacientka No 192 je nosičkou mutace c.818G>A (p.Arg273His). (**b**) Pacientka No 233 je nosičkou mutace c.998G>A (p.Arg333His). (**c**) – Pacientka No 604 je nosičkou mutace c.760A>G (p.Ile254Val). (**d**) Pacientka No 1071 je nosičkou mutace c.815T>G (p.Val272Gly).
*číslování mutací: +1 odpovídá A z ATG iniciačního kodónu v referenční sekvenci NM_000546;
wt – sekvence normální alely; mut – mutovaná alela.

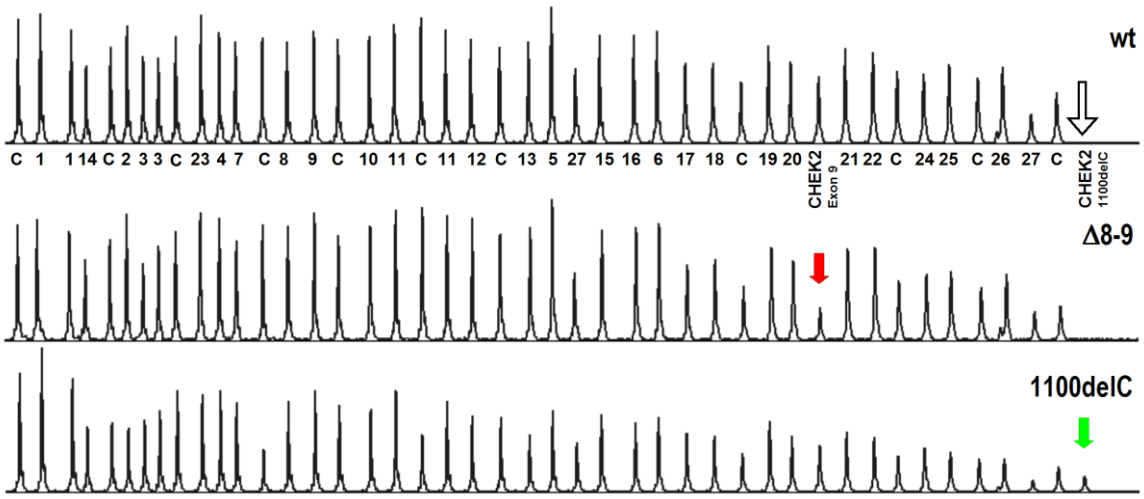
Tabulka 15: Dědičné mutace genu *TP53*.

Exon	Pojmenování mutace dle gDNA[a] pojmenování mutace dle cDNA[b]	Předpokládaný efekt mutace	Pacient No	BC & OC v rodině [c] (věk v době diagnózy)	Jiné tumory
7	[a] g.14087A>G [b] c.760A>G	p.Ile254Val	604	BC (**51**, 50)	–
8	[a] g.14487G>A [b] c.818G>A	p.Arg273His	192	BC (**28**, 30)	–
8	[a] g.14484 T>G [b] c.815T>G	p.Val272Gly	1071	BC (**27**, 49)	plíce (52)
10	[a] g.17576 G>A [b] c.998G>A	p.Arg333His	233	BC (**55***); OC (**55***)	–

[a] Referenční sekvence: GenBank X54156; [b] referenční sekvence NM_000546; číslování mutací: +1 odpovídá A z ATG iniciačního kodónu; [c] BC a/nebo OC probanda a u přímých příbuzných; věk v době diagnózy probanda je uvedený *tučně podtrženě*; hvězdička (*) označuje pacienta s BC i OC; BC – karcinom prsu; OC – karcinom ovaria

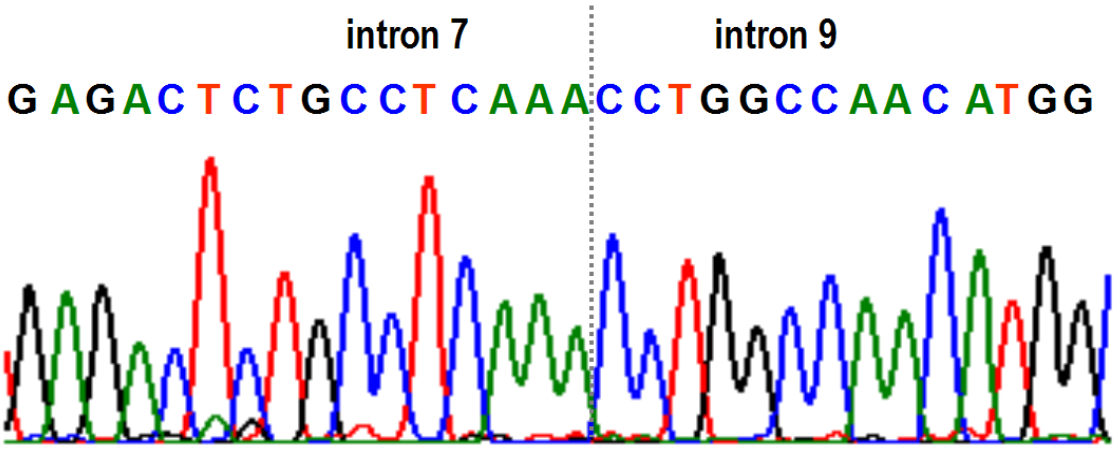
4. Mutační analýza genu *CHEK2*

Analýza genu *CHEK2*, zejména analýza mutace c.1100delC a ve střední Evropě rovněž delece 5395 bp zahrnující exony 8-9, se považuje za klinicky významnou v rodinách s hereditárním karcinomem prsu, kde nebyla prokázána mutace v hlavních predispozičních genech [168]. Detekce těchto mutací v souboru 586 *BRCA1/2* negativních pacientů byla provedena pomocí MLPA analýzy, jak bylo popsáno v metodické části. Příklad detekce těchto mutací je znázorněn na obrázku 18.



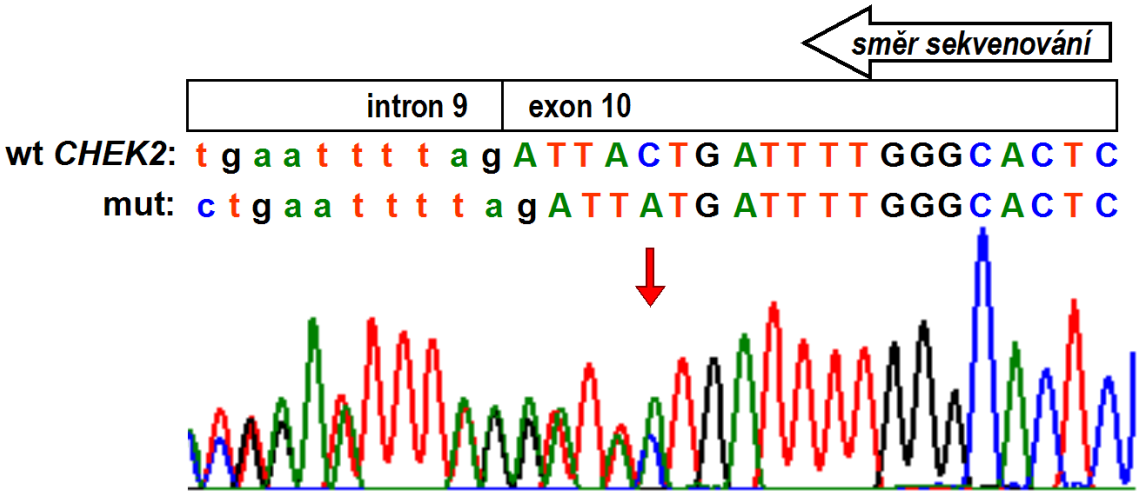
Obrázek 18: Detekce posunové mutace c.1100delC a delece 5395 nukleotidů zasahující exony 8-9 genu *CHEK2* pomocí MLPA analýzy (SALSA MLPA kit P045) - porovnáním vzorku pacienta s mutací s normálním obrazem kontrolního vzorku (wt). C – kontrolní DNA fragment; čísla odpovídají jednotlivým exonům genu *BRCA2*; *červená šipka* ukazuje v analyzovaném vzorku deleci exonů 8-9 genu *CHEK2*; *zelená šipka* ukazuje na vrchol, který se objeví specificky u vzorků s posunovou mutací c.1100delC.

Mutace detekované v genu *CHEK2* byly potvrzeny sekvenováním příslušného úseku genomové DNA (Obr.19 a 20). Obě mutace zasahují do kinázové domény proteinu (Obr. 6).



Obrázek 19: Potvrzení delece 5395 bp zasahující exony 8-9 genu *CHEK2* sekvenováním. Místa zlomu v intronu 7 a 9 jsou označena přerušovanou čárou.

Delece exonů 8-9 byla detekována u pěti pacientů. U dvou mužů (No 323 a 900) s karcinomem prsu, dvou žen (No 435 a 604) s karcinomem prsu a jedné ženy (No 1168) s bilaterálním karcinomem prsu.



Obrázek 20: Potvrzení mutace c.1100delC sekvenováním. Deletovaný nukleotid je označen šipkou; wt – sekvence normální alely; mut – mutovaná alela.
Primér CHEK04r použitý v sekvenační reakci sekvenoval minus řetězec referenční sekvence, v programu pro prohlížení sekvencí byla sekvence konvertována do plus vlákna, aby sekvence nukleotidů odpovídala udané referenční sekvenci, proto je zdvojená sekvence v důsledku deletovaného C na levé straně od deletovaného nukleotidu.

Mutace c.1100delC byla detekována celkem čtyřikrát; u dvou pacientek (No 931 a 943) s karcinomem prsu do 35 let, u pacientky (No 284) s karcinomem ovaria diagnostikovaným v 18 letech a u zdravé klientky (No 1079) z rodiny s výskytem karcinomu prsu z matčiny strany.

Charakteristika rodin s detekovanou mutací v genu *CHEK2* je shrnuta v tabulce 16.

Tabulka 16: Dědičné mutace genu *CHEK2*.

Exon	Mutace dle gDNA[a] Mutace dle cDNA[b]	Předpokládaný efekt mutace	Pacient No	BC & OC v rodině [c] (věk v době diagnózy)	Jiné tumory
8-9	[a] g.39870_45264del5395 [b] c.909-2028_1095+330del 5395	p.Met304Leu fsX16	323	BC (**56**, 40)	žaludek, rektum, prostata
			435	BC (**33**, 60)	–
			604	BC (**51**, 50)	–
			900	BC (**43**)	podčelistní uzlina
			1168	BC (**53/53**)	Hodgkinův lymfom (14)
10	[a] g.45966delC [b] c.1100delC	p.Thr367Met fsX15	284	OC (**18**)	–
			931	BC (**32**, ?)	–
			943	BC (**35**)	–
			1079	BC (57, 38)	prostata

[a] Referenční sekvence: GenBank NG_011520.12 complement (8474298..8528391); [b] nomenklatura mutací: +1 odpovídá A z ATG iniciačního kodónu translace v referenční sekvenci NM_007194.3; [c] BC a/nebo OC probanda a u přímých příbuzných; věk v době diagnózy probanda je uvedený *tučně podtrženě*; hvězdička (*) označuje pacienta s BC I OC; věk v případě diagnózy bilaterálního karcinomu prsu je oddělen lomítkem (/);muž proband je označen červeně; BC – karcinom prsu; OC – karcinom ovaria

DISKUZE

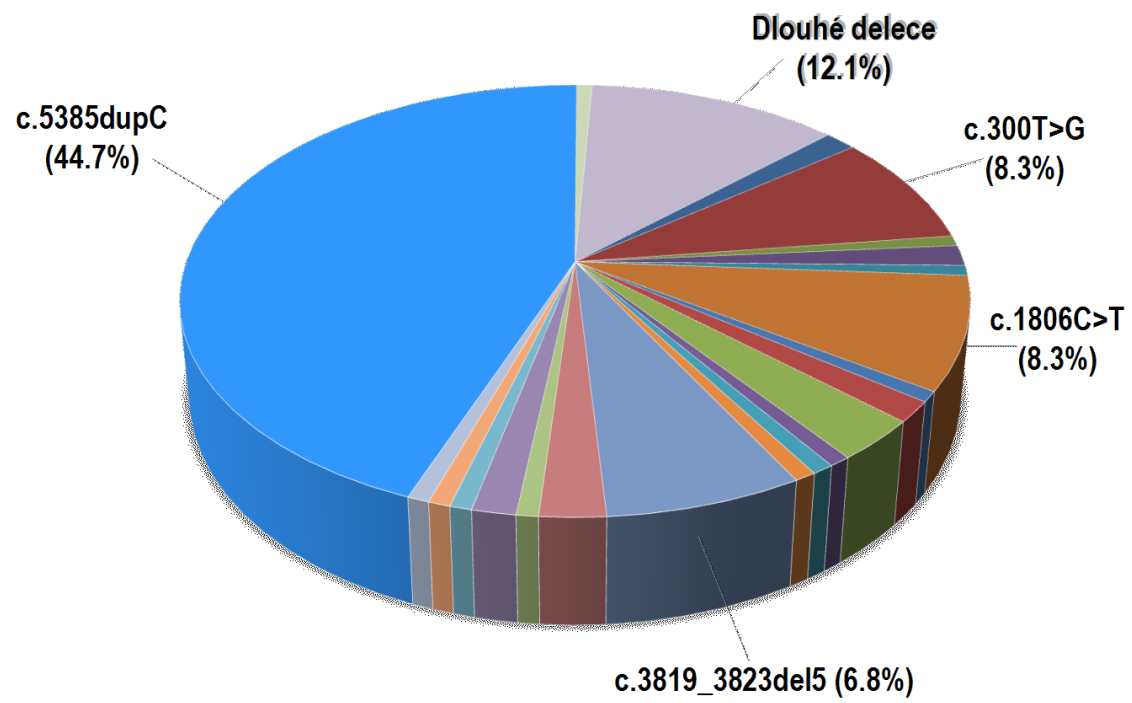
Byly analyzovány rozsáhlé delece a přestavby genů *BRCA1/2* u vysoce rizikových pacientek s karcinomem prsu nebo ovaria, které byly pomocí metod založených na PCR amplifikaci vhodných genových fragmentů negativně testovány na přítomnost bodových mutací či krátkých inzercí nebo delecí. Základním cílem studie bylo charakterizovat jednotlivé alterace, určit frekvenci jejich výskytu a určit jak se v naší populaci podílí v rizikových rodinách na vývoji karcinomu prsu a ovaria.

1. Analýza rozsáhlých genových přestaveb

1.1 Výskyt rozsáhlých přestaveb v genech *BRCA1* a *BRCA2*

Ve studované skupině pacientů bylo detekováno 16 rozsáhlých přestaveb genu *BRCA1*, což odpovídá 12,1% všech nalezených mutací genu *BRCA1* (Obr. 21). Frekvence výskytu velkých přestaveb nalezených v naší studii [151] byla nižší než v Nizozemsku (27,3%) [117] a Itálii (19%) [120], nelišila se však významně od četnosti popsané v Dánsku (12,5%) [115], Francii (12%) [114], Německu (9,6%) [113] a Španělsku (8,2%) [112]. Obdobná frekvence byla popsána i v první studii, která byla provedena v České republice na Moravě, kde u vysoce rizikových pacientek představovaly velké přestavby 10,4 % (10/96) všech detekovaných mutací genu *BRCA1* v 290 analyzovaných rodinách [104]. Pouze dvě alterace (delece exonů 5-14 a 21-22) nalezené v obou částech republiky však byly identické. Dvě nejčastější mutace specifické pro českou populaci, delece exonů 1-17 a 5-14, představovaly 50% (8/16) rozsáhlých přestaveb genu *BRCA1* identifikovaných v naší studii. Zatímco delece zasahující exony 1-17 byla popsána pouze v našem souboru pacientek z pražského regionu, delece zasahující exony 5-14 byla detekována čtyřikrát v naší i v moravské populaci [104] a představuje pravděpodobně nejčastější rozsáhlou přestavbu genu BRCA1 v České republice. Komplexní přestavba zahrnující deleci exonů 21-22 byla detekována u dvou případů v naší i moravské populaci [104] a pravděpodobně se jedná o další populačně specifickou mutaci genu *BRCA1*. Delece exonů 1-2 a duplikace exonu 13 byly jedinými alteracemi, které jsou rozšířeny v Evropě i v Americe [108,109]. Pět z osmi různých rozsáhlých přestaveb detekovaných v našem souboru nebylo dosud

popsáno v literatuře. Častý výskyt jedinečných mutací je ve shodě s výsledky analýz z různých zemí [108,109].



Obrázek 21: Spektrum mutací genu *BRCA1* v souboru 740 rizikových českých pacientů [100].

V testovaném souboru 586 pacientů jsme nezachytili žádnou přestavbu genu *BRCA2*. Tento výsledek může být ve shodě s výsledky analýz prováděných v dalších zemích, kde byla četnost rozsáhlých přestaveb tohoto genu velmi nízká. V Německu byla v souboru 450 rodin popsána jediná dlouhá delece genu *BRCA2*. Vyšetřeným nosičem byl muž s karcinomem prsu [113]. V Dánsku byla také popsána v souboru 642 pacientů jediná delece genu *BRCA2* a ta se rovněž vyskytla u vysoce rizikové rodiny, kde byl karcinom prsu diagnostikován u muže [115]. Častěji byly přestavby genu *BRCA2* v rodinách s případy karcinomu prsu u muže popsány ve Španělsku (2/20) [169] a ve Francii (3/39) [170]. V našem souboru bylo pouze 5 rodin s výskytem karcinomu prsu u muže a přestavbu genu *BRCA2* jsme u nich nenalezli.

Naproti tomu naše výsledky nejsou ve shodě se studiemi provedenými ve Francii [171], Španělsku [169] nebo v USA [71], kde přestavby genu *BRCA2* byly popsány i v rodinách, ve kterých nebyly zaznamenány případy karcinomu prsu u muže.

1.2 Charakterizace rozsáhlých přestaveb

Byla popsána řada metod pro screening rozsáhlých genových přestaveb (Str. 25). V současné době se však detekce nejčastěji provádí pomocí MLPA analýzy. Tato technika byla rovněž zvolena pro detekci rozsáhlých genových přestaveb v naší populaci.

Všechny rozsáhlé přestavby v lokusu *BRCA1* zachylené pomocí MLPA analýzy byly potvrzeny sekvenováním. Sekvenování aberantních fragmentů (amplifikovaných pomocí LR-PCR) obsahujících delece umožnilo určit místa zlomů genomové DNA, případně analyzovat komplexní genomovou přestavbu. Ojedinělé falešně pozitivní nálezy MLPA analýzy (zejména jednoexonové delece či duplikace) byly rozřešeny opakováním analýzy z dalšího nezávisle izolovaného vzorku DNA. V případě genu *BRCA1* bylo možné použít alternativní kit s rozdílnými sondami; sekvenováním příslušného exonu bylo možné vyloučit přítomnost variant interferujících s hybridizací sondy.

Amplifikace aberantního fragmentu obsahujícího deleci (přestavbu) a určení bodů zlomu může být obtížné, pokud delece zasahuje do dlouhého intronu nebo za hranici genu. Z tohoto důvodu jsme zpočátku nemohli charakterizovat nové přestavby zasahující exony 1-17 a 21-24 a teprve použití chromozóm specifické oligonukleotidové aCGH na mikročipu s vysokou hustotou sond umožnilo odhadnout hranice deletované oblasti s požadovanou přesností (desítky až stovky nukleotidů). Oligonukleotidový čip specifický pro chromozóm 17 je komerčně dostupný (Roche NimbleGen) a hustota sond je srovnatelná s čipy připravenými dle potřeb zákazníka (takzvanými čipy na míru), které byly popsány nedávno [126]. Použitelnost této techniky byla ověřena na vzorku DNA od pacientky No 897 s již charakterizovanou delecí exonů 18-22 a následně byly analyzovány vzorky s neznámými hranicemi delece. Ve všech případech byl rozsah delece určen s vysokou přesností, což umožnilo navrhnout vhodné priméry pro PCR amplifikaci relativně krátkého aberantního fragmentu (o délce nižší než 1500 bp, který byl vhodný pro snadnou sekvenační analýzu (Obr. 12). Vzorek No 609 s deletovanými exony 21-24 (delece 25639 kb) byl testován jak chromozóm specifickou (medián vzdálenosti sousedících sond byl přibližně 160 bp), tak celogenomovou aCGH (medián vzdálenosti sousedících sond byl přibližně 7000 bp). Delece byla identifikována pouze při použití chromozóm specifické aCGH. Rozlišovací schopnost celogenomové aCGH nebyla dostačující.

1.3 Mechanizmus vzniku rozsáhlých přestaveb

Homologní rekombinace mezi *Alu* sekvencemi je nejčastější příčinou přestaveb postihujících lokus *BRCA1*. Důvodem může být neobvykle vysoká četnost *Alu* sekvencí (tvoří asi 5% lidského genomu [111]) v lokusu *BRCA1*. Další poměrně častou příčinou dlouhých delecí genu *BRCA1* je rekombinace homologní genové sekvence s duplikovanou oblastí obsahující *BRCA1* pseudogen (*ΨBRCA1*) [108,109]. Při rekombinaci mezi geny *BRCA1*/*ΨBRCA1* dochází k rozsáhlé deleci, která vede ke vzniku chimérního genu složeného z *ΨBRCA1* exonů 1A, 1B a 2 fúzovaného s exony 3-24 genu *BRCA1*. Byla popsána řada přestaveb s různými body zlomu, které překvapivě vedly k přibližně stejně dlouhé deleci (~37 kb) [108,109]. Deletovaná oblast zahrnuje promotorovou oblast genu *BRCA1*, proto tento fúzní gen není transkribován [35,36].

V našem souboru má 5 z 9 různých přestaveb (delece exonů 1-17, 5-10, 18-22, 21-22 a duplikace exonu 13) původ v rekombinaci mezi *Alu* repetitivními sekvencemi. Naopak delece exonů 5-14, 13-19 a 21-24 nebyly způsobeny *Alu*/*Alu* rekombinací. Delece exonů 1-2 vzniká v důsledku rekombinace mezi vysoce homologními sekvencemi intronu 2 genu *BRCA1* a intronu 2 genu *ΨBRCA1* [36] (Tab. 11).

2. Úloha genu *TP53* v rodinách s hereditární predispozicí ke karcinomu prsu

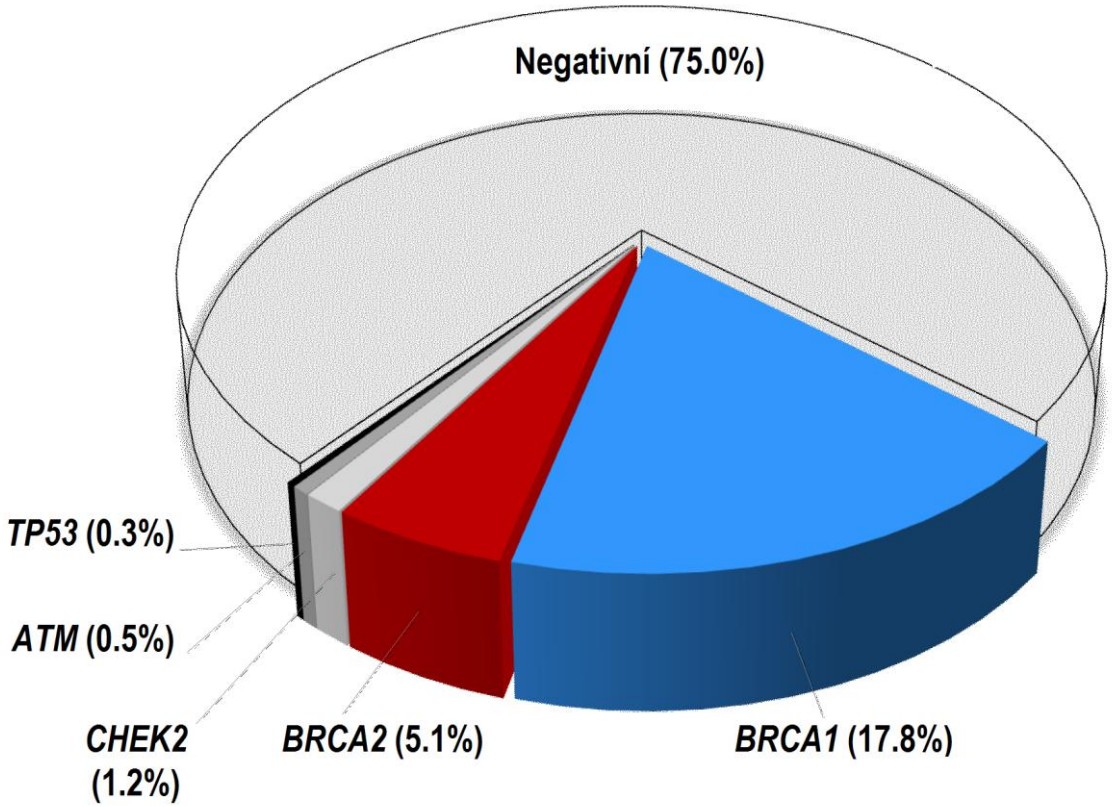
Dědičné mutace genu *TP53* jsou odpovědné za většinu případů Li-Fraumeniho syndromu (LFS, OMIM 151623). Jedná se o poměrně vzácný nádorový syndrom s autozomálně dominantní dědičností, charakterizovaný mnohačetnými primárními nádory u dětí a mladých dospělých (<45 let). Jedinci s LFS jsou ohroženi zejména nádory prsu, sarkomy (sarkomy měkkých tkání a osteosarkomy) nádory mozku, nádory nadledvin, hematologickými malignitami a nádory plic a dalších tkání [61,62,172].

Mezi 586 analyzovanými pacienty byly zjištěny 4 missense varianty genu *TP53*, z čehož tři se nacházely v DNA vazebné doméně. Tento výsledek reflektuje skutečnost, že většinu mutací genu *TP53* tvoří missense mutace (74,5%) a nejvíce jich bylo popsáno v DNA vazebné doméně (82,1%) [167]. Mutace, c.815T>G a c.818G>A (vedoucí k záměně v aminokyselinové sekvenci proteinu p53, p.Arg273His a p.Val272Gly), zachycené u dvou velmi mladých pacientek (do 28 let) již byly opakovaně prokázány

u případů karcinomu prsu [167] a lze je považovat za patogenní. Ani jednu z detekovaných nosiček však nelze zařadit do rodin s Li-Fraumeniho (či Li-Fraumeni-like) syndromem. Aminokyselina kódovaná kodónem 273 se nachází společně s aminokyselinami č. 175, 176, 220, 245, 248, 249 a 282 v takzvané DNA vazebné smyčce. Mutace v této oblasti jsou spojeny s horší prognózou přežití jedinců s diagnostikovaným karcinomem prsu [173].

Rozhodnout o patogenitě dalších sekvenčních variant není na základě našich výsledků možné. Varianta c.760A>G byla detekována u pacientky z HBC rodiny, která onemocněla karcinomem prsu ve věku 50 let. Stejná alterace byla zachycena v nádorové tkáni u pacientky s dědičným karcinomem prsu asociovaným s mutací genu *BRCA1* [174]. Mutace c.998G>A (p.Arg333His), která se nachází v C-koncové tetramerizační doméně, byla nalezena u pacientky s duplicitou karciomu prsu a ovaria v 55 letech. Tato sekvenční varianta nebyla dosud popsána v literatuře ani jako somatická ani jako dědičná mutace. Podle prediktivního programu GVGD [175] se nejedná o patogenní mutaci. Výsledky z funkčních esejí uvedené v databázi IARC (http://www-p53.iarc.fr/p53MUTfunction.html) naznačují, že tato varianta je funkční [167].

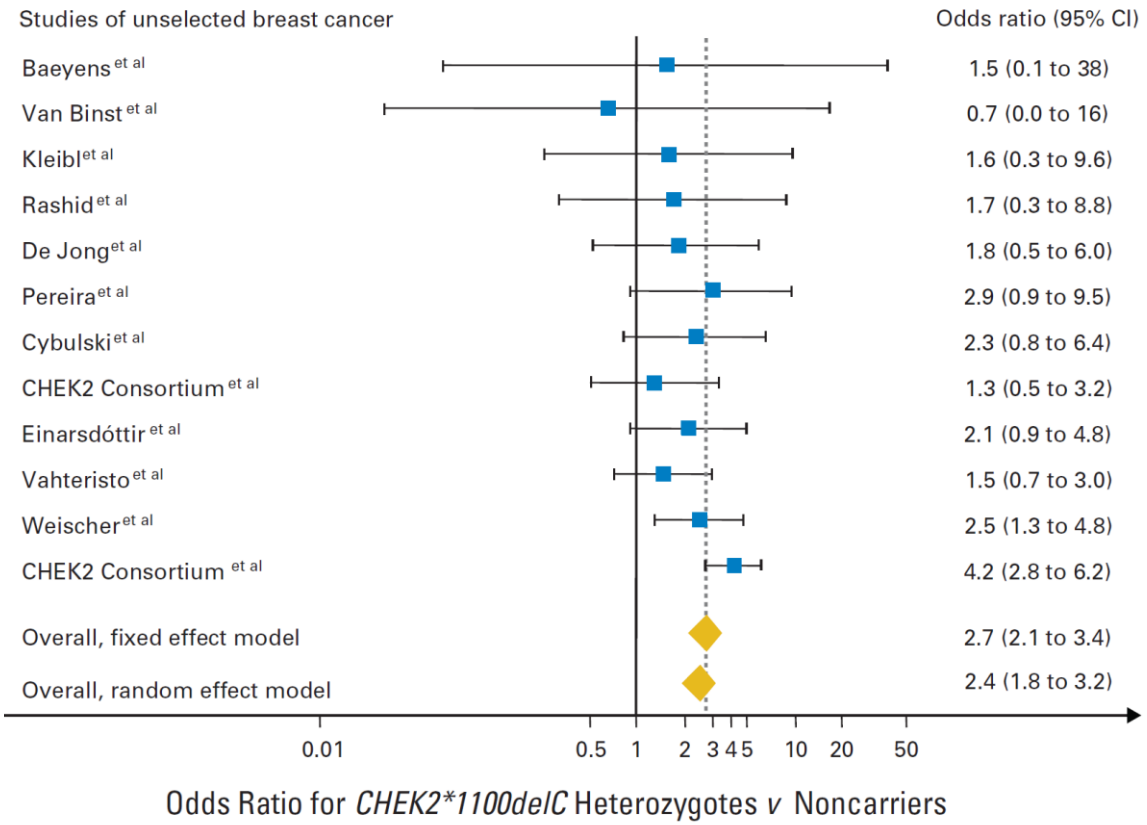
Naše výsledky ukazují, že mutace genu *TP53* se ve srovnání s dalšími predispozičními geny (*BRCA1/2, CHEK2, ATM*) vyskytují zřídka ve vysoce rizikových rodinách s karcinomem prsu nebo ovaria. Byly detekovány pouze u 0,3% (2/740) analyzovaných pacientů (Obr. 22).



Obrázek 22: Procentuální zastoupení mutací v nejdůležitějších predispozičních genech v souboru 740 rizikových pacientů [100].

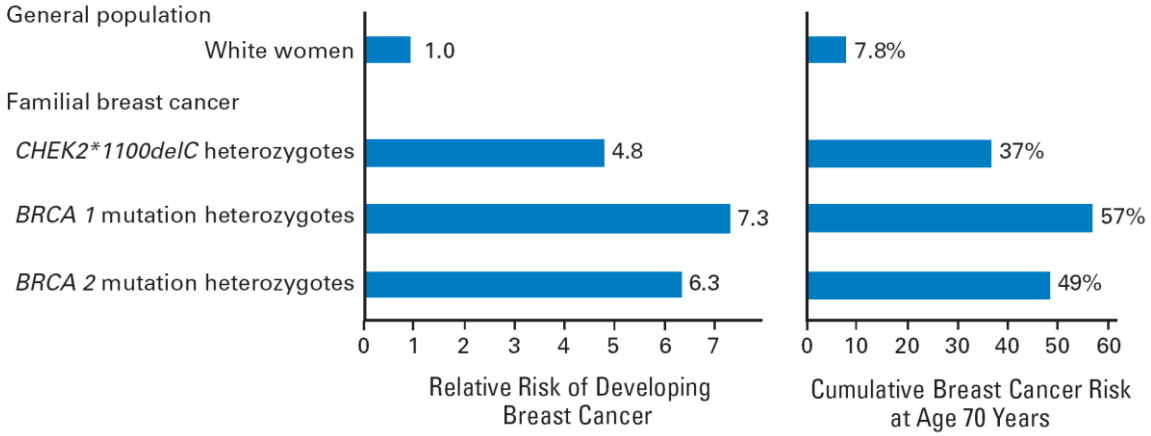
3. Úloha genu *CHEK2* v rodinách s hereditární predispozicí ke karcinomu prsu

Význam genu *CHEK2* u hereditárního karcinomu prsu byl poprvé demonstrován v roce 2002 [74]. Meta-analýza zaměřená na klinický význam nejčastěji studované posunové mutace c.1100delC (NM_007194.3: c.1100delC) ukázala u nosičů dvojnásobné až trojnásobné zvýšení rizika vzniku karcinomu prsu (Obr. 23; [176]).



Obrázek 23: Meta-analýza sledující asociaci mutace c.1100delC genu *CHEK2* s vývojem karcinomu prsu (převzato z [176]).

Kumulativní riziko vzniku karcinomu prsu bylo pro nosiče mutace c.1100delC odhadnuto na (37%). Toto riziko je ve srovnání s běžnou populací (7,8%) výrazně vyšší; naopak ve srovnání s nosiči mutací genu *BRCA1* (57%) a *BRCA2* (49%) je nižší (Obr. 24; [176]).



Obrázek 24: Porovnání rizika vzniku karcinomu prsu u nosičů mutací genů *BRCA1/2 a CHEK2* c.1100delC (převzato z [176]).

Druhá analyzovaná mutace vedoucí ke zkrácení proteinového řetězce je delece 5395 bp zasahující exony 8-9 genu *CHEK2*. Byla popsána jako mutace, která zvyšuje riziko karcinomu prsu a poprvé byla zachycena v České republice [71] Jedná se o mutaci, která se vyskytuje u slovanské populace; byla rovněž nalezena na Slovensku a v Polsku [71,177].

V našem souboru vyšetřovaných pacientů byly mutace genu *CHEK2* prokázány u 9 jedinců (1,5%; 9/586). Frekvence jejich výskytu je výrazně nižší než u hlavních predispozičních genů *BRCA1/2*. Ve srovnání s dalšími geny, které byly analyzovány v naší laboratoři (*TP53, ATM*) je však jejich výskyt významně častější (Obr. 22).

ZÁVĚR

V České republice má incidence zhoubných nádorů prsu trvale rostoucí charakter. Vývoj nádoru je následkem kumulace genových alterací. Postiženy jsou především geny, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu a udržování stability genomu. Dědičné mutace genů *BRCA1* a *BRCA2* odpovídají za významnou část případů dědičného karcinomu prsu a ovarií. Nicméně na vzniku karcinomu prsu se mohou podílet i další geny, mezi něž patří i tumor supresory *TP53* a *CHEK2*

Cílem práce bylo zjistit v naší populaci s dědičným karcinomem prsu frekvenci výskytu rozsáhlých přestaveb v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2*. To zahrnovalo zavedení a optimalizaci metod pro jejich detekci a charakterizaci.

Pro screening rozsáhlých přestaveb byla zvolena metoda MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification). Pro jejich charakterizaci pak byly použity metody LR-PCR a sekvenování. Charakterizace bodů zlomu je zásadní částí analýzy rozsáhlých přestaveb a v některých případech může být usnadněna použitím chromozóm specifické aCGH, která je vhodná pro přesné určení rozsahu deletované či duplikované oblasti.

V souboru 586 vysoce rizikových pacientek, u kterých nebyla prokázána běžnými PCR technikami mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2*, bylo identifikováno 16 rozsáhlých přestaveb, které tvoří 12,1% (16/132) všech patogenních mutací nalezených v genu *BRCA1*. Většinou se jednalo o rozsáhlou deleci postihující velkou část proteinu, často s posunem čtecího rámce vedoucím k předčasné terminaci translace. Pět z devíti různých alterací vznikly následkem homologní rekombinace mezi *Alu* repetitivními oblastmi. Nejčastěji detekovanými alteracemi byly delece exonů 1-17, 5-14 a 21-22. Haplotypová analýza u pacientů s těmito mutacemi byla provedena pomocí analýzy vhodných mikrosatelitových markerů pokrývajících ~857 kb lokusu *BRCA1* a následnou fragmentační analýzou na přístroji ABI Prism 3130. Výsledek této analýzy naznačuje, že se jedná o populačně specifické mutace.

Pro porovnání četnosti nalezených mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* s předpokládaným počtem mutací v našem souboru jsme použili program BRCAPRO. Předpokládaná četnost přibližně odpovídala počtu nalezených mutací. Program BRCAPRO byl zaveden do praxe klinických genetiků a díky výpočtu na základě osobní a rodinné anamnézy usnadní rozhodnutí o indikaci k vyšetření genů *BRCA1* a *BRCA2*.

Naše výsledky ukazují, že analýza rozsáhlých přestaveb genu *BRCA1* by měla být prováděna nejen u vysoce rizikových pacientek s karcinomem prsu nebo ovaria s rodinnou zátěží, ale i u sporadických případů, především u pacientek s časným karcinomem prsu nebo ovaria. Screening velkých přestaveb genu *BRCA2* by měl být prováděn v rizikových rodinách s karcinomem prsu u mužů, protože právě v těchto rodinách byly rozsáhlé přestavby několikrát popsány.

Dalším cílem bylo zjištění úlohy genů *TP53* a *CHEK2* v patogenezi dědičného karcinomu prsu u stejného souboru pacientů. Pro mutační analýzu těchto genů bylo opět nutné optimalizovat metody pro detekci a ověření alterace. Využili jsme technik MLPA, RT-PCR, PCR a přímého sekvenování. Všechny nalezené alterace genu *TP53* byly missense mutace. Dvě patogenní mutace byly identifikovány u dvou velmi mladých pacientek z HBC rodin, což naznačuje, že skupina *BRCA1/2* negativních mladých pacientů s karcinomem prsu nebo ovaria by mohla být indikována k mutační analýze genu *TP53,* i v případě, že nesplňuje kritéria Li-Fraumeniho syndromu. Naše výsledky dále ukazují, že zejména analýza genu *CHEK2*, kde dvě opakující se posunové mutace (c.1100delC a rozsáhlá delece zahrnující exony 8-9) byly zachyceny v 9 rodinách, může být klinicky významná.

Mutační analýza hlavních predispozičních genů *BRCA1* a *BRCA2* a dále genů *TP53, CHEK2* a *ATM* se provádí v naší laboratoři u pacientů s diagnostikovaným karcinomem prsu nebo ovaria, indikovaných na základě anamnézy či výsledků programu BRCAPRO ke genetickému vyšetření. Při průkazu mutace se dále provádí prediktivní testování v postižených rodinách, které umožňuje rozhodnout o predispozici k nádorovému onemocnění. U osob se zvýšeným rizikem je pak možné se zaměřit na časnou diagnostiku nádorového onemocnění nebo uvažovat o preventivním chirurgickém výkonu.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli Doc. MUDr. Petru Pohlreichovi, CSc., který mě uvedl do problematiky analýzy genů přispívajících ke vzniku nádorových onemocnění prsu a ovarií. Velmi si cením jeho rad, podpory a taktního směřování k cíli.

Za cenné rady a inspirující debaty, které významně ovlivnily mé studium a práci bych dále chtěla poděkovat hlavně docentovi MUDr. Zdeňku Kleiblovi, PhD. a samozřejmě i ostatním spolupracovníkům a kamarádům z naší laboratoře.

V neposlední řadě děkuji svým nejbližším za vytvoření příjemného rodinného zázemí, bez kterého by to nešlo.

V Praze dne 20. srpna 2010.

Tato práce vznikla za podpory IGA MZ CR 9051-3/2006, IGA MZCR NS 10304-3/2009 a VZ MŠMT MSM0021620808.

SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Plný název
aCGH	array komparativní genomová hybridizace (array Comparative genomic hybridization)
Alu	repetitivní DNA sekvence obsažená v lidském genomu, která patří do třídy SINEs; původně popsána jako sekvence citlivá k restrikční endonukleáze z organizmu *Arthrobacterium luteus*
ATM	gen *ATM (ataxia telangiectasia mutated)*
BACH1	gen *BACH1* (BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1)
BIC	Breast Cancer Information Core
BRCA1	Breast Cancer gene 1
BRCA2	Breast Cancer gene 2
BRIP1	gen *BRIP1* (BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1)
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)
C50	Kód MKN pro karcinom prsu
C55	Kód MKN pro karcinom ovaria
CHEK2	gen *CHEK2* (checkpoint kinase 2)
DCIS	Duktální karcinom *in situ* (Ductal carcinoma *in situ*)
ER	Estrogenové receptory
FAM	6-karboxyfluorescein
FANCD2	gen FANCD2 (Fanconi anemia, complementation group D2)
gDNA	Genomová DNA
HBC	Rodina s dědičným syndromem karcinomu prsu (hereditary breast cancer family)
HBOC	Rodina s dědičným syndromem karcinomu prsu a ovaria (hereditary breast and ovarian cancer family)
HER2/neu	Receptor pro epidermální růstový faktor (Human epidermal growth factor receptor 2; známý také jako ErbB-2)
HOC	Rodina s dědičným syndromem karcinomu ovaria (hereditary ovarian cancer family)

HR	homologní rekombinace
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDC	Invazivní duktální karcinom
ILC	Invazivní lobulární karcinom
ILDC	Invazivní duktolobulární karcinom
LCIS	Lobulární karcinom in situ
LINEs	Rozptýlené dlouhé repetice (Long interspersed elements)
LR-PCR	long-range PCR
MKN	Mezinárodní klasifikace nemocí
MLPA	Multiple ligation-dependent probe amplification
mRNA	messenger RNA
mut	mutace /mutovaná alela
NBS1	gen nibrin (Nijmegen breakage syndrome 1)
NHEJ	Nehomologní spojoání konců (Non-homology end joining)
PALB2	Partner and localizer of *BRCA2*
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PR	Progesteronové receptory
RAD50	gen *RAD 50*
RING	Motiv zinkového prstu (zinc-finger domain)
rpm	Otáčky za minutu (Revolutions per minute)
RT-PCR	Zpětná PCR (Reverse transcription PCR)
SINEs	Krátké rozptýlené repetice (Short interspersed elements)
TAMRA	5(6)-carboxytetramethylrhodamine, succinimidyl ester
T_{an}	anelační teplota
TP53	gen *TP53*
UICC	Mezinárodní unie proti rakovině
USA	Spojené státy americké (United States of America)

ÚBEO	Ústav biochemi a experimentální onkologie, 1. LF UK
wt	normální alela (wild type)
Δ	delece

SEZNAM OBRÁZKŮ

Číslo	Název	Strana
1	Časový vývoj hrubé incidence a hrubé mortality pro diagnózu karcinomu prsu v celé populaci České republiky.	Str. 4
2	Počet hlášených případů karcinomu prsu a zemřelých na tuto diagnózu v dané věkové kategorii.	Str. 5
3	Schématické znázornění duplikovaného regionu v oblasti chromozómu 17q21.	Str. 11
4	Schématické znázornění některých strukturních a funkčních domén proteinů BRCA1 a BRCA2.	Str. 12
5	Schématické znázornění některých strukturních a funkčních domén proteinu p53.	Str. 13
6	Funkční domény genu *CHEK2* a struktura proteinu CHK2.	Str. 15
7	Princip MLPA analýzy.	Str. 27
8	Umístění vyšetřovaných mikrosatelitových markerů vzhledem ke genu *BRCA1*.	Str. 43
9	MLPA_fragmentační analýza pěti nových delecí.	Str. 49
10	Ukázka vyhodnocení MLPA analýzy pomocí programu Coffalyzer.	Str. 50
11	Ukázka SegMNT analýzy v programu SignalMap.	Str. 51
12	Charakterizace a určení bodů zlomu dlouhých delecí v genu *BRCA1* pomocí aCGH specifické pro chromozóm 17, LR-PCR a sekvenování.	Str. 53
13	Charakterizace 6 kb dlouhé duplikace zahrnující exon 13 a určení zlomu pomocí PCR a sekvenování.	Str. 54
14	Charakterizace a určení bodů zlomu komplexní genomové přestavby zahrnující deleci exonů 5-10 a inzerci 35 nukleotidů pomocí LR-PCR a sekvenování.	Str. 56
15	Charakterizace a určení bodů zlomu genomové delece exonů 13-19 pomocí LR-PCR a sekvenování.	Str. 57
16	Příklad fragmentační analýzy mikrosatelitového markeru D17S855 na automatickém sekvenátoru ABI Prism 3130.	Str. 58
17	Missense mutace nalezené v genu *TP53* potvrzené sekvenováním DNA.	Str. 60
18	Detekce posunové mutace c.1100delC a delece 5395 nukleotidů zasahující exony 8-9 v genu *CHEK2* pomocí MLPA analýzy.	Str. 61
19	Sekvenováním potvrzená delece dlouhá 5395 nukleotidů zasahující exony 8-9 genu *CHEK2*.	Str. 62
20	Posunová mutace c.1100delC ověřena sekvenováním.	Str. 62
21	Spektrum mutací genu *BRCA1* v souboru 740 rizikových českých pacientů.	Str. 65

22	Procentuální zastoupení mutací v nejdůležitějších predispozičních genech v souboru 740 rizikových pacientů.	Str. 69
23	Meta-analýza sledující asociaci mutace c.1100delC genu *CHEK2* s vývojem karcinomu prsu.	Str. 70
24	Porovnání rizika vzniku karcinomu prsu u nosičů mutací genů *BRCA1/2* a *CHEK2* c.1100delC.	Str. 70

SEZNAM TABULEK

Číslo	Název	Strana
1	Procentuální zastoupení jednotlivých histologických typů karcinomu prsu.	Str. 6
2	Spektrum bodových mutací a krátkých delecí a inzercí mutací genu *BRCA1* detekovaných u českých pacientů.	Str. 20
3	Spektrum bodových mutací a krátkých delecí a inzercí mutací genu *BRCA2* detekovaných u českých pacientů.	Str. 21
4	Spektrum mutací genu *ATM* detekovaných u českých pacientů.	Str. 22
5	Priméry použité pro amplifikaci kódující oblasti genu *TP53*.	Str. 34
6	Priméry použité pro amplifikaci genu *TP53* z genomové DNA.	Str. 35
7	Priméry použité pro detekci mutace c.1100delC genu *CHEK2* pomocí nested-PCR.	Str. 36
8	Priméry použité pro ověření delece 5395 bp genu *CHEK2*.	Str. 37
9	Priméry použité pro LR-PCR a pro sekvenování fragmentů nesoucích deleci.	Str. 41
10	Priméry pro amplifikaci mikrosatelitů a přibližná délka jednotlivých amplikonů.	Str. 43
11	Dědičné přestavby v genu *BRCA1*.	Str. 46-47
12	Frekvence genomových mutací ve vztahu ke klasifikaci pacientů a rodin.	Str. 47
13	Predikovaná pravděpodobnost nosičství mutace spočtená BRCAPRO a skutečný záchyt mutací v genu *BRCA1*.	Str. 48
14	Analýza mikrosatelitových markerů u pacientů s delecí exonů 1-17, 5-14 a 21-22.	Str. 59
15	Dědičné mutace genu *TP53*.	Str. 60
16	Dědičné mutace genu *CHEK2*.	Str. 63

SEZNAM PŘÍLOH

Číslo	Název
1	Ticha I, Kleibl Z, Stribrna J, Kotlas J, Zimovjanova M, Mateju M, Zikan M, Pohlreich P Screening for genomic rearrangements in *BRCA1* and *BRCA2* genes in Czech high-risk breast/ovarian cancer patients: high proportion of population specific alterations in *BRCA1* gene. Breast Cancer Res Treat (2010) [Epub ahead of print]
2	Ticha I, Kleiblova P, Fidlerova J, Novotny J, Pohlreich P, Kleibl Z Lack of large intragenic rearrangements in dihydropyrimidine dehydrogenase (*DPYD*) gene in fluoropyrimidine-treated patients with high-grade toxicity. Cancer Chemother Pharmacol (2009) 64:615-618.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Couch FJ, Weber BL (1998) Breast cancer. In The genetic basis of human cancer. 1st edition. Edited by: Vogelstein B, Kinzler KW. New York: McGraw-Hill 537-563.

2. Abrahámová J, Povýšil C., Horák J. a kolektiv (2000) Atlas nádorů prsu. Grada Publishing

3. Sobin LH, Wittekind Ch (2002) International Union Against Cancer (UICC): TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New Yourk: Wiley

4. Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, Ellis I, Elston C (1995) Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. Hum Pathol 26:873-879.

5. Janatova M, Zikan M, Dundr P, Matous B, Pohlreich P (2005) Novel somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic breast tumors. Hum Mutat 25:319

6. Breast Cancer Linkage Consortium (1997) Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. Lancet 349:1505-1510.

7. D'Eredita' G, Giardina C, Napoli A, Troilo VL, Fischetti F, Berardi T (2010) Familial and Sporadic Breast Cancers: Differences in Clinical, Histopathological and Immunohistochemical Features. Int J Surg Pathol [Epub ahead of print]

8. Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 68:820-823.

9. Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A (2001) Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. J Natl Cancer Inst 93:1215-1223.

10. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG (2000) Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. J Natl Cancer Inst 92:564-569.

11. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. Cancer Res 61:3225-3229.

12. Dobrovic A, Simpfendorfer D (1997) Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. Cancer Res 57:3347-3350.

13. Papa S, Seripa D, Merla G, Gravina C, Giai M, Sismondi P, Rinaldi M, Serra A, Saglio G, Fazio VM (1998) Identification of a possible somatic BRCA1 mutation affecting translation efficiency in an early-onset sporadic breast cancer patient. J Natl Cancer Inst 90:1011-1012.

14. Signori E, Bagni C, Papa S, Primerano B, Rinaldi M, Amaldi F, Fazio VM (2001) A somatic mutation in the 5'UTR of BRCA1 gene in sporadic breast cancer causes down-modulation of translation efficiency. Oncogene 20:4596-4600.

15. Nathanson KL, Wooster R, Weber BL (2001) Breast cancer genetics: what we know and what we need. Nat Med 7:552-556.

16. Bradbury AR, Olopade OI (2007) Genetic susceptibility to breast cancer. Rev Endocr Metab Disord 8:255-267.

17. Oldenburg RA, Meijers-Heijboer H, Cornelisse CJ, Devilee P (2007) Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? Crit Rev Oncol Hematol 63:125-149.

18. Walsh T, King MC (2007) Ten genes for inherited breast cancer. Cancer Cell 11:103-105.

19. Bartek J, Lukas J, Bartkova J (2007) DNA damage response as an anti-cancer barrier: damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency'. Cell Cycle 6:2344-2347.

20. Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. Nature 461:1071-1078.

21. van den Bosch M, Lohman PH, Pastink A (2002) DNA double-strand break repair by homologous recombination. Biol Chem 383:873-892.

22. Sung P, Klein H (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. Nat Rev Mol Cell Biol 7:739-750.

23. Cahill D, Connor B, Carney JP (2006) Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair. Front Biosci 11:1958-76.

24. Sonoda E, Hochegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S (2006) Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. DNA Repair (Amst) 5:1021-1029.

25. You Z, Bailis JM (2010) DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. Trends Cell Biol 20:402-409.

26. Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. DNA Repair (Amst) 6:923-935.

27. O'Donovan P, Livingston DM (2010) BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double strand break repair. Carcinogenesis 31:961-967.

28. Kerr P, Ashworth A (2001) New complexities for BRCA1 and BRCA2. Curr Biol 11:R668-R676.

29. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 250:1684-1689.

30. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, . (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 266:66-71.

31. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, Hood L, King MC (1996) Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. Genome Res 6:1029-1049.

32. Brown MA, Xu CF, Nicolai H, Griffiths B, Chambers JA, Black D, Solomon E (1996) The 5' end of the BRCA1 gene lies within a duplicated region of human chromosome 17q21. Oncogene 12:2507-2513.

33. Xu CF, Brown MA, Nicolai H, Chambers JA, Griffiths BL, Solomon E (1997) Isolation and characterisation of the NBR2 gene which lies head to head with the human BRCA1 gene. Hum Mol Genet 6:1057-1062.

34. Xu CF, Chambers JA, Solomon E (1997) Complex regulation of the BRCA1 gene. J Biol Chem 272:20994-20997.

35. Brown MA, Lo LJ, Catteau A, Xu CF, Lindeman GJ, Hodgson S, Solomon E (2002) Germline BRCA1 promoter deletions in UK and Australian familial breast cancer patients: Identification of a novel deletion consistent with BRCA1:psiBRCA1 recombination. Hum Mutat 19:435-442.

36. Puget N, Gad S, Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S (2002) Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot. Am J Hum Genet 70:858-865.

37. Huyton T, Bates PA, Zhang X, Sternberg MJ, Freemont PS (2000) The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. Mutat Res 460:319-332.

38. Meza JE, Brzovic PS, King MC, Klevit RE (1999) Mapping the functional domains of BRCA1. Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. J Biol Chem 274:5659-5665.

39. Morris JR, Solomon E (2004) BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. Hum Mol Genet 13:807-817.

40. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R (1996) Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. Nat Genet 14:430-440.

41. Chapman MS, Verma IM (1996) Transcriptional activation by BRCA1. Nature 382:678-679.

42. Monteiro AN, August A, Hanafusa H (1996) Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. Proc Natl Acad Sci U S A 93:13595-13599.

43. Chen CF, Li S, Chen Y, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH (1996) The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. J Biol Chem 271:32863-32868.

44. Thakur S, Zhang HB, Peng Y, Le H, Carroll B, Ward T, Yao J, Farid LM, Couch FJ, Wilson RB, Weber BL (1997) Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. Mol Cell Biol 17:444-452.

45. Huber LJ, Yang TW, Sarkisian CJ, Master SR, Deng CX, Chodosh LA (2001) Impaired DNA damage response in cells expressing an exon 11-deleted murine Brca1 variant that localizes to nuclear foci. Mol Cell Biol 21:4005-4015.

46. Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID (2003) BRCA1 gene in breast cancer. J Cell Physiol 196:19-41.

47. Huen MS, Sy SM, Chen J (2010) BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. Nat Rev Mol Cell Biol 11:138-148.

48. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 378:789-792.

49. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, Thorlacius S, Offit K, Stoppa-Lyonnet D, Belanger C, Bell R, Berry S, Bogden R, Chen Q, Davis T, Dumont M, Frye C, Hattier T, Jammulapati S, Janecki T, Jiang P, Kehrer R, Leblanc JF, Mitchell JT, McArthur-Morrison J, Nguyen K, Peng Y, Samson C, Schroeder M, Snyder SC, Steele L, Stringfellow M, Stroup C, Swedlund B, Swense J, Teng D, Thomas A, Tran T, Tranchant M, Weaver-Feldhaus J, Wong AK, Shizuya H, Eyfjord JE, Cannon-Albright L, Tranchant M, Labrie F, Skolnick MH, Weber B, Kamb A, Goldgar DE (1996) The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. Nat Genet 12:333-337.

50. Yang X, Lippman ME (1999) BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 54:1-10.

51. Scully R, Puget N (2002) BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast cancer. Biochimie 84:95-102.

52. Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Sheer D, Shows TB, Bruns GA, Peacock J (1985) Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. Somat Cell Mol Genet 11:505-510.

53. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM (1986) Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. Nature 320:84-85.

54. Woods DB, Vousden KH (2001) Regulation of p53 function. Exp Cell Res 264:56-66.

55. Miyashita T, Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 80:293-299.

56. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88:323-331.

57. Elledge RM, Allred DC (1998) Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 52:79-98.

58. Pharoah PD, Day NE, Caldas C (1999) Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. Br J Cancer 80:1968-1973.

59. Soussi T, Wiman KG (2007) Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. Cancer Cell 12:303-312.

60. Soussi T, Dehouche K, Beroud C (2000) p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. Hum Mutat 15:105-113.

61. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, . (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science 250:1233-1238.

62. Trkova M, Foretova L, Kodet R, Hedvicakova P, Sedlacek Z (2003) A Li-Fraumeni syndrome family with retained heterozygosity for a germline TP53 mutation in two tumors. Cancer Genet Cytogenet 145:60-64.

63. Hollestelle A, Wasielewski M, Martens JW, Schutte M (2010) Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes. Curr Opin Genet Dev 20:268-276

64. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. Science 282:1893-1897.

65. Prokopcova J, Kleibl Z, Banwell CM, Pohlreich P (2007) The role of ATM in breast cancer development. Breast Cancer Res Treat 104:121-128.

66. Bartek J, Lukas J (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. Cancer Cell 3:421-429.

67. Durocher D, Jackson SP (2002) The FHA domain. FEBS Lett 513:58-66.

68. Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE, Haber DA (1999) Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. Science 286:2528-2531.

69. Cybulski C, Gorski B, Huzarski T, Masojc B, Mierzejewski M, Debniak T, Teodorczyk U, Byrski T, Gronwald J, Matyjasik J, Zlowocka E, Lenner M, Grabowska E, Nej K, Castaneda J, Medrek K, Szymanska A, Szymanska J, Kurzawski G, Suchy J, Oszurek O, Witek A, Narod SA, Lubinski J (2004) CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. Am J Hum Genet 75:1131-1135.

70. Nevanlinna H, Bartek J (2006) The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. Oncogene 25:5912-5919.

71. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, Roach KC, Mandell J, Lee MK, Ciernikova S, Foretova L, Soucek P, King MC (2006) Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. JAMA 295:1379-1388.

72. Kleibl Z, Havranek O, Novotny J, Kleiblova P, Soucek P, Pohlreich P (2008) Analysis of CHEK2 FHA domain in Czech patients with sporadic breast cancer revealed distinct rare genetic alterations. Breast Cancer Res Treat 112:159-164.

73. Kleibl Z, Havranek O, Hlavata I, Novotny J, Sevcik J, Pohlreich P, Soucek P (2009) The CHEK2 gene I157T mutation and other alterations in its proximity increase the risk of sporadic colorectal cancer in the Czech population. Eur J Cancer 45:618-624.

74. Meijers-Heijboer H, van den OA, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, Hollestelle A, Houben M, Crepin E, Veghel-Plandsoen M, Elstrodt F, van Duijn C, Bartels C, Meijers C, Schutte M, McGuffog L, Thompson D, Easton D, Sodha N, Seal S, Barfoot R, Mangion J, Chang-Claude J, Eccles D, Eeles R, Evans DG, Houlston R, Murday V, Narod S, Peretz T, Peto J, Phelan C, Zhang HX, Szabo C, Devilee P, Goldgar D, Futreal PA, Nathanson KL, Weber B, Rahman N, Stratton MR (2002) Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. Nat Genet 31:55-59.

75. (2004) CHEK2*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. Am J Hum Genet 74:1175-1182.

76. Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K et al. (1988) Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. Nature 336:577-580.

77. Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature 421:499-506.

78. Lakin ND, Weber P, Stankovic T, Rottinghaus ST, Taylor AM, Jackson SP (1996) Analysis of the ATM protein in wild-type and ataxia telangiectasia cells. Oncogene 13:2707-2716.

79. Rotman G, Shiloh Y (1997) Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative damage and stress? Bioessays 19:911-917.

80. Gumy-Pause F, Wacker P, Sappino AP (2004) ATM geme and lymphoid malignancies. Leukemia 18:238-242.

81. Angele S, Hall J (2000) The ATM gene and breast cancer: is it really a risk factor? Mutat Res 462:167-178.

82. Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL (1991) Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. N Engl J Med 325:1831-1836.

83. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, North B, Jayatilake H, Barfoot R, Spanova K, McGuffog L, Evans DG, Eccles D; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR, Rahman N. (2006) ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. Nat Genet 38:873-875.

84. Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, McGuire GM, Robinson P, Weber P, Bedenham T, Bradwell AR, Easton DF, Lennox GG, Haites N, Byrd PJ, Taylor AM. (1998) ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. Am J Hum Genet 62:334-345.

85. Concannon P, Gatti RA (1997) Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia. Hum Mutat 10:100-107.

86. Soukupova J, Dundr P, Kleibl Z, Pohlreich P (2008) Contribution of mutations in ATM to breast cancer development in the Czech population. Oncol Rep 19:1505-1510.

87. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M (1998) Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet 62:676-689.

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

89. Greene MH (1997) Genetics of breast cancer. Mayo Clin Proc 72:54-65.

90. Thompson D, Easton DF (2002) Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. J Natl Cancer Inst 94:1358-1365.

91. King MC, Marks JH, Mandell JB (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. Science 302:643-646.

92. Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL (2010) Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. Genet Med 12:245-259.

93. Neuhausen SL, Godwin AK, Gershoni-Baruch R, Schubert E, Garber J, Stoppa-Lyonnet D, Olah E, Csokay B, Serova O, Lalloo F, Osorio A, Stratton M, Offit K, Boyd J, Caligo MA, Scott RJ, Schofield A, Teugels E, Schwab M, Cannon-Albright L, Bishop T, Easton D, Benitez J, King MC, Ponder BA, Weber B, Devilee P, Borg A, Narod SA, Goldgar D (1998) Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent BRCA2 mutations in 111 families: results of an international study. Am J Hum Genet 62:1381-1388.

94. Szabo CI, King MC (1997) Population genetics of BRCA1 and BRCA2. Am J Hum Genet 60:1013-1020.

95. Hartge P, Struewing JP, Wacholder S, Brody LC, Tucker MA (1999) The prevalence of common BRCA1 and BRCA2 mutations among Ashkenazi Jews. Am J Hum Genet 64:963-970.

96. Verhoog LC, van den Ouweland AM, Berns E, Veghel-Plandsoen MM, van Staveren IL, Wagner A, Bartels CC, Tilanus-Linthorst MM, Devilee P, Seynaeve C, Halley DJ, Niermeijer MF, Klijn JG, Meijers-Heijboer H (2001) Large regional differences in the frequency of distinct BRCA1/BRCA2 mutations in 517 Dutch breast and/or ovarian cancer families. Eur J Cancer 37:2082-2090.

97. Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drusedau M, Hogervorst FB, Hageman S, Arts PJ, Ligtenberg MJ, Meijers-Heijboer H, Klijn JG, Vasen HF, Cornelisse CJ, 't Veer LJ, Bakker E, van Ommen GJ, Devilee P (1997) BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. Nat Genet 17:341-345.

98. Thorlacius S, Struewing JP, Hartge P, Olafsdottir GH, Sigvaldason H, Tryggvadottir L, Wacholder S, Tulinius H, Eyfjord JE (1998) Population-based study of risk of breast cancer in carriers of BRCA2 mutation. Lancet 352:1337-1339.

99. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS (1996) Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. Nat Genet 14:185-187.

100. P. Pohlreich, J. Stribrna, I. Ticha, J. Soukupova, Z. Kleibl, M. Zikan, M. Zimovjanova, J. Kotlas, A. Panczak (2010) Predisposing genes in hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic. EJC Supplements 8:16.

101. Machackova E, Foretova L, Lukesova M, Vasickova P, Navratilova M, Coene I, Pavlu H, Kosinova V, Kuklova J, Claes K (2008) Spectrum and characterisation of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer. BMC Cancer 8:140.

102. Pohlreich P, Zikan M, Stribrna J, Kleibl Z, Janatova M, Kotlas J, Zidovska J, Novotny J, Petruzelka L, Szabo C, Matous B (2005) High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. Breast Cancer Res 7:R728-R736.

103. Mateju M, Stribrna J, Zikan M, Kleibl Z, Janatova M, Kormunda S, Novotny J, Soucek P, Petruzelka L, Pohlreich P (2010) Population-based study of BRCA1/2 mutations: Family history based criteria identify minority of mutation carriers. Neoplasma 57:280-285.

104. Vasickova P, Machackova E, Lukesova M, Damborsky J, Horky O, Pavlu H, Kuklova J, Kosinova V, Navratilova M, Foretova L (2007) High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangements in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic. BMC Med Genet 8:32.

105. Zikan M, Pohlreich P, Stribrna J, Kleibl Z, Cibula D (2008) Novel complex genomic rearrangement of the BRCA1 gene. Mutat Res 637:205-208.

106. Malkin D (1998) Li-Fraumeny Syndrome. In The genetic basis of human cancer. 1st edition. Edited by: Vogelstein B, Kinzler KW. New York: McGraw-Hill 393-407.

107. Puget N, Torchard D, Serova-Sinilnikova OM, Lynch HT, Feunteun J, Lenoir GM, Mazoyer S (1997) A 1-kb Alu-mediated germ-line deletion removing BRCA1 exon 17. Cancer Res 57:828-831.

108. Sluiter MD, van Rensburg EJ (2010) Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. Breast Cancer Res Treat [Epub ahead of print].

109. Mazoyer S (2005) Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. Hum Mutat 25:415-422.

110. Welcsh PL, King MC (2001) BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. Hum Mol Genet 10:705-713.

111. Deininger PL, Batzer MA (1999) Alu repeats and human disease. Mol Genet Metab 67:183-193.

112. de la Hoya M, Gutierrez-Enriquez S, Velasco E, Osorio A, Sanchez de Abajo A, Vega A, Salazar R, Esteban E, Llort G, Gonzalez-Sarmiento R, Carracedo A, Benitez J, Miner C, Diez O, Diaz-Rubio E, Caldes T (2006) Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer. Clin Chem 52:1480-1485.

113. Engert S, Wappenschmidt B, Betz B, Kast K, Kutsche M, Hellebrand H, Goecke TO, Kiechle M, Niederacher D, Schmutzler RK, Meindl A (2008) MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. Hum Mutat 29:948-958.

114. Gad S, Caux-Moncoutier V, Pages-Berhouet S, Gauthier-Villars M, Coupier I, Pujol P, Frenay M, Gilbert B, Maugard C, Bignon YJ, Chevrier A, Rossi A, Fricker JP, Nguyen TD, Demange L, Aurias A, Bensimon A, Stoppa-Lyonnet D (2002) Significant contribution of large BRCA1 gene rearrangements in 120 French breast and ovarian cancer families. Oncogene 21:6841-6847.

115. Hansen TV, Jonson L, Albrechtsen A, Andersen MK, Ejlertsen B, Nielsen FC (2009) Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. Breast Cancer Res Treat 115:315-323.

116. Puget N, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova OM, Pages S, Lynch HT, Lenoir GM, Mazoyer S (1999) Screening for germ-line rearrangements and regulatory mutations in BRCA1 led to the identification of four new deletions. Cancer Res 59:455-461.

117. Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Pruntel R, Regnerus R, van Welsem T, van Spaendonk R, Menko FH, Kluijt I, Dommering C, Verhoef S, Schouten JP, van't Veer LJ, Pals G (2003) Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. Cancer Res 63:1449-1453.

118. Puget N, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Audoynaud C, Pages S, Lynch HT, Goldgar D, Lenoir GM, Mazoyer S (1999) An Alu-mediated 6-kb duplication in the BRCA1 gene: a new founder mutation? Am J Hum Genet 64:300-302.

119. The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group (2000) The exon 13 duplication in the BRCA1 gene is a founder mutation present in geographically diverse populations. Am J Hum Genet 67:207-212.

120. Agata S, Viel A, Della PL, Cortesi L, Fersini G, Callegaro M, Dalla PM, Dolcetti R, Federico M, Venuta S, Miolo G, D'Andrea E, Montagna M (2006) Prevalence of BRCA1 genomic rearrangements in a large cohort of Italian breast and breast/ovarian cancer families without detectable BRCA1 and BRCA2 point mutations. Genes Chromosomes Cancer 45:791-797.

121. Stadler ZK, Saloustros E, Hansen NA, Schluger AE, Kauff ND, Offit K, Robson ME (2010) Absence of genomic BRCA1 and BRCA2 rearrangements in Ashkenazi breast and ovarian cancer families. Breast Cancer Res Treat 123:581-585.

122. Buffone A, Capalbo C, Ricevuto E, Sidoni T, Ottini L, Falchetti M, Cortesi E, Marchetti P, Scambia G, Tomao S, Rinaldi C, Zani M, Ferraro S, Frati L, Screpanti I, Gulino A, Giannini G (2007) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in a cohort of consecutive Italian breast and/or ovarian cancer families. Breast Cancer Res Treat 106:289-296.

123. Preisler-Adams S, Schonbuchner I, Fiebig B, Welling B, Dworniczak B, Weber BH (2006) Gross rearrangements in BRCA1 but not BRCA2 play a notable role in

predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk families of German origin. Cancer Genet Cytogenet 168:44-49.

124. Pylkas K, Erkko H, Nikkila J, Solyom S, Winqvist R (2008) Analysis of large deletions in BRCA1, BRCA2 and PALB2 genes in Finnish breast and ovarian cancer families. BMC Cancer 8:146.

125. Agata S, Dalla PM, Callegaro M, Scaini MC, Menin C, Ghiotto C, Nicoletto O, Zavagno G, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E, Montagna M (2005) Large genomic deletions inactivate the BRCA2 gene in breast cancer families. J Med Genet 42:e64.

126. Staaf J, Torngren T, Rambech E, Johansson U, Persson C, Sellberg G, Tellhed L, Nilbert M, Borg A (2008) Detection and precise mapping of germline rearrangements in BRCA1, BRCA2, MSH2, and MLH1 using zoom-in array comparative genomic hybridization (aCGH). Hum Mutat 29:555-564.

127. Swensen J, Hoffman M, Skolnick MH, Neuhausen SL (1997) Identification of a 14 kb deletion involving the promoter region of BRCA1 in a breast cancer family. Hum Mol Genet 6:1513-1517.

128. Montagna M, Santacatterina M, Torri A, Menin C, Zullato D, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E (1999) Identification of a 3 kb Alu-mediated BRCA1 gene rearrangement in two breast/ovarian cancer families. Oncogene 18:4160-4165.

129. Rohlfs EM, Chung CH, Yang Q, Skrzynia C, Grody WW, Graham ML, Silverman LM (2000) In-frame deletions of BRCA1 may define critical functional domains. Hum Genet 107:385-390.

130. Unger MA, Nathanson KL, Calzone K, Antin-Ozerkis D, Shih HA, Martin AM, Lenoir GM, Mazoyer S, Weber BL (2000) Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing. Am J Hum Genet 67:841-850.

131. Rohlfs EM, Puget N, Graham ML, Weber BL, Garber JE, Skrzynia C, Halperin JL, Lenoir GM, Silverman LM, Mazoyer S (2000) An Alu-mediated 7.1 kb deletion of BRCA1 exons 8 and 9 in breast and ovarian cancer families that results in alternative splicing of exon 10. Genes Chromosomes Cancer 28:300-307.

132. Hogervorst FB, Cornelis RS, Bout M, van Vliet M, Oosterwijk JC, Olmer R, Bakker B, Klijn JG, Vasen HF, Meijers-Heijboer H, . (1995) Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. Nat Genet 10:208-212.

133. Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S (2002) The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. Hum Mol Genet 11:2805-2814.

134. Barrois M, Bieche I, Mazoyer S, Champeme MH, Bressac-de Paillerets B, Lidereau R (2004) Real-time PCR-based gene dosage assay for detecting BRCA1 rearrangements in breast-ovarian cancer families. Clin Genet 65:131-136.

135. Casilli F, Di Rocco ZC, Gad S, Tournier I, Stoppa-Lyonnet D, Frebourg T, Tosi M (2002) Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. Hum Mutat 20:218-226.

136. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res 30:e57.

137. Frolov A, Prowse AH, Vanderveer L, Bove B, Wu H, Godwin AK (2002) DNA array-based method for detection of large rearrangements in the BRCA1 gene. Genes Chromosomes Cancer 35:232-241.

138. van den Ijssel P, Tijssen M, Chin SF, Eijk P, Carvalho B, Hopmans E, Holstege H, Bangarusamy DK, Jonkers J, Meijer GA, Caldas C, Ylstra B. (2005) Human and mouse oligonucleotide-based array CGH. Nucleic Acids Res 33:e192.

139. Del Valle J, Feliubadalo L, Nadal M, Teule A, Miro R, Cuesta R, Tornero E, Menendez M, Darder E, Brunet J, Capella G, Blanco I, Lazaro C (2009) Identification and comprehensive characterization of large genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. Breast Cancer Res Treat 122:733-744.

140. Nath J, Johnson KL (2000) A review of fluorescence in situ hybridization (FISH): current status and future prospects. Biotech Histochem 75:54-78.

141. Szinay D, Bai Y, Visser R, de Jong H (2010) FISH applications for genomics and plant breeding strategies in tomato and other solanaceous crops. Cytogenet Genome Res 129:199-210.

142. Barrett MT, Scheffer A, Ben Dor A, Sampas N, Lipson D, Kincaid R, Tsang P, Curry B, Baird K, Meltzer PS, Yakhini Z, Bruhn L, Laderman S (2004) Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 101:17765-17770.

143. Parmigiani G, Chen S, Iversen ES, Jr., Friebel TM, Finkelstein DM, Anton-Culver H, Ziogas A, Weber BL, Eisen A, Malone KE, Daling JR, Hsu L, Ostrander EA, Peterson LE, Schildkraut JM, Isaacs C, Corio C, Leondaridis L, Tomlinson G, Amos CI, Strong LC, Berry DA, Weitzel JN, Sand S, Dutson D, Kerber R, Peshkin BN, Euhus DM (2007) Validity of models for predicting BRCA1 and BRCA2 mutations. Ann Intern Med 147:441-450.

144. Lindor NM, Lindor RA, Apicella C, Dowty JG, Ashley A, Hunt K, Mincey BA, Wilson M, Smith MC, Hopper JL (2007) Predicting BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers: comparison of LAMBDA, BRCAPRO, Myriad II, and modified Couch models. Fam Cancer 6:473-482.

145. Bartoňková H., Foretová L., Helmichová E., Kalábová R., Kleibl Z., Konopásek B., Krutílková V., Macháčková E., Novotný J., Petráková K., Petruželka L., Plevová P., Pohlreich P., Rob L., Skovajsová M., Veselý J., Žaloudík J. (2003) Doporučené zásady péče o nemocné s nádory prsu a vaječníků a zdravé osoby se zárodečnými mutacemi genů BRCA1 nebo BRCA2. Klinická onkologie 16:28-34.

146. Plevova P, Novotny J, Petrakova K, Palacova M, Kalabova R, Schneiderova M, Foretova L (2009) [Hereditary breast and ovarian cancer syndrome]. Klin Onkol 22 Suppl S8-11.

147. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 1987, 162:156-159.

148. Sodha N, Williams R, Mangion J, Bullock SL, Yuille MR, Eeles RA (2000) Screening hCHK2 for mutations. Science 289:359.

149. Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, Albin N, Diasio RB (1997) Structural organization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. Cancer Res 57:1660-1663.

150. Hormozian F, Schmitt JG, Sagulenko E, Schwab M, Savelyeva L (2007) FRA1E common fragile site breaks map within a 370kilobase pair region and disrupt the dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD). Cancer Lett 246:82-91.

151. Ticha I, Kleiblova P, Fidlerova J, Novotny J, Pohlreich P, Kleibl Z (2009) Lack of large intragenic rearrangements in dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) gene in fluoropyrimidine-treated patients with high-grade toxicity. Cancer Chemother Pharmacol 64:615-618.

152. Workman C, Jensen LJ, Jarmer H, Berka R, Gautier L, Nielser HB, Saxild HH, Nielsen C, Brunak S, Knudsen S (2002) A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. Genome Biol 3:research0048.

153. Olshen AB, Venkatraman ES, Lucito R, Wigler M (2004) Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. Biostatistics 5:557-572.

154. den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. Hum Mutat 15:7-12.

155. Koreth J, O'Leary JJ, O'D MJ (1996) Microsatellites and PCR genomic analysis. J Pathol 178:239-248.

156. Miller MJ, Yuan BZ (1997) Semiautomated resolution of overlapping stutter patterns in genomic microsatellite analysis. Anal Biochem 251:50-56.

157. Ticha I, Kleibl Z, Stribrna J, Kotlas J, Zimovjanova M, Mateju M, Zikan M, Pohlreich P (2010) Screening for genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2 genes in Czech high-risk breast/ovarian cancer patients: high proportion of population specific alterations in BRCA1 gene. Breast Cancer Res Treat [Epub ahead of print].

158. Montagna M, Dalla PM, Menin C, Agata S, De Nicolo A, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E (2003) Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. Hum Mol Genet 12:1055-1061.

159. Antoniou AC, Hardy R, Walker L, Evans DG, Shenton A, Eeles R, Shanley S, Pichert G, Izatt L, Rose S, Douglas F, Eccles D, Morrison PJ, Scott J, Zimmern RL, Easton DF, Pharoah PD (2008) Predicting the likelihood of carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation: validation of BOADICEA, BRCAPRO, IBIS, Myriad and the Manchester scoring system using data from UK genetics clinics. J Med Genet 45:425-431.

160. van Harssel JJ, van Roozendaal CE, Detisch Y, Brandao RD, Paulussen AD, Zeegers M, Blok MJ, Gomez Garcia EB (2010) Efficiency of BRCAPRO and Myriad II mutation probability thresholds versus cancer history criteria alone for BRCA1/2 mutation detection. Fam Cancer 9:193-201

161. Cerutti R, Sahnane N, Carnevali I, Furlan D, Tibiletti MG, Chiaravalli AM, Capella C (2010) Identification of the first case of germline duplication of BRCA1 exon 13 in an Italian family. Fam Cancer 9:275-282

162. Narod SA, Foulkes WD (2004) BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. Nat Rev Cancer 4:665-676.

163. Glover JN, Williams RS, Lee MS (2004) Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. Trends Biochem Sci 29:579-585.

164. Breast Cancer information Core database (BIC), http://research.nhgri.nih.gov/BIC, Accessed 26 Nov 2009.

165. Glover JN (2006) Insights into the molecular basis of human hereditary breast cancer from studies of the BRCA1 BRCT domain. Fam Cancer 5:89-93.

166. Armaou S, Konstantopoulou I, Anagnostopoulos T, Razis E, Boukovinas I, Xenidis N, Fountzilas G, Yannoukakos D (2007) Novel genomic rearrangements in the BRCA1 gene detected in Greek breast/ovarian cancer patients. Eur J Cancer 43:443-453.

167. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M (2007) Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum Mutat 28:622-629. Poslední verze databáze: R14, November 2009.

168. Narod SA (2010) Testing for CHEK2 in the cancer genetics clinic: ready for prime time? Clin Genet 78:1-7.

169. Gutierrez-Enriquez S, de la HM, Martinez-Bouzas C, Sanchez dA, Cajal T, Llort G, Blanco I, Beristain E, Diaz-Rubio E, Alonso C, Tejada MI, Caldes T, Diez O (2007) Screening for large rearrangements of the BRCA2 gene in Spanish families with breast/ovarian cancer. Breast Cancer Res Treat 103:103-107.

170. Tournier I, Paillerets BB, Sobol H, Stoppa-Lyonnet D, Lidereau R, Barrois M, Mazoyer S, Coulet F, Hardouin A, Chompret A, Lortholary A, Chappuis P, Bourdon V, Bonadona V, Maugard C, Gilbert B, Nogues C, Frebourg T, Tosi M (2004) Significant contribution of germline BRCA2 rearrangements in male breast cancer families. Cancer Res 64:8143-8147.

171. Casilli F, Tournier I, Sinilnikova OM, Coulet F, Soubrier F, Houdayer C, Hardouin A, Berthet P, Sobol H, Bourdon V, Muller D, Fricker JP, Capoulade-Metay C,

Chompret A, Nogues C, Mazoyer S, Chappuis P, Maillet P, Philippe C, Lortholary A, Gesta P, Bezieau S, Toulas C, Gladieff L, Maugard CM, Provencher DM, Dugast C, Delvincourt C, Nguyen TD, Faivre L, Bonadona V, Frebourg T, Lidereau R, Stoppa-Lyonnet D, Tosi M (2006) The contribution of germline rearrangements to the spectrum of BRCA2 mutations. J Med Genet 43:e49.

172. Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF, Jr., Li FP (2001) Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 10:83-87.

173. Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bieche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Borresen-Dale AL (2006) The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. Clin Cancer Res 12:1157-1167.

174. Foulkes WD, Chappuis PO, Wong N, Brunet JS, Vesprini D, Rozen F, Yuan ZQ, Pollak MN, Kuperstein G, Narod SA, Begin LR (2000) Primary node negative breast cancer in BRCA1 mutation carriers has a poor outcome. Ann Oncol 11:307-313.

175. Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, de Silva D, Zharkikh A, Thomas A (2006) Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. J Med Genet 43:295-305.

176. Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG (2008) CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. J Clin Oncol 26:542-548.

177. Cybulski C, Wokolorczyk D, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Gorski B, Debniak T, Masojc B, Jakubowska A, van de WT, Narod SA, Lubinski J (2007) A deletion in CHEK2 of 5,395 bp predisposes to breast cancer in Poland. Breast Cancer Res Treat 102:119-122.

PŘÍLOHA 1

Ticha I, Kleibl Z, Stribrna J, Kotlas J, Zimovjanova M, Mateju M, Zikan M, Pohlreich P

Screening for genomic rearrangements in *BRCA1* and *BRCA2* genes in Czech high-risk breast/ovarian cancer patients: high proportion of population specific alterations in *BRCA1* gene.

Breast Cancer Res Treat (2010) Epub Feb 5 [Epub ahead of print]. (**IF_{2008} = 5.684**)

Breast Cancer Res Treat
DOI 10.1007/s10549-010-0745-y

PRECLINICAL STUDY

Screening for genomic rearrangements in *BRCA1* and *BRCA2* genes in Czech high-risk breast/ovarian cancer patients: high proportion of population specific alterations in *BRCA1* gene

Ivana Ticha · Zdenek Kleibl · Jana Stribrna · Jaroslav Kotlas · Martina Zimovjanova · Martin Mateju · Michal Zikan · Petr Pohlreich

Received: 26 November 2009 / Accepted: 12 January 2010
© Springer Science+Business Media, LLC. 2010

Abstract Large genomic rearrangements (LGR) represent substantial proportion of pathogenic mutations in the *BRCA1* gene, whereas the frequency of rearrangements in the *BRCA2* gene is low in many populations. We screened for LGRs in *BRCA1* and *BRCA2* genes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in 521 unrelated patients negative for *BRCA1/2* point mutations selected from 655 Czech high-risk breast and/or ovarian cancer patients. Besides long range PCR, a chromosome 17-specific oligonucleotide-based array comparative genomic hybridization (aCGH) was used for accurate location of deletions. We identified 14 patients carrying 8 different LGRs in *BRCA1* that accounted for 12.3% of all pathogenic *BRCA1* mutations. No LGRs were detected in the *BRCA2* gene. In a subgroup of 239 patients from high-risk families, we found 12 LGRs (5.0%), whereas two LGRs were revealed in a subgroup of 282 non-familial cancer cases (0.7%). Five LGRs (deletion of exons 1–17, 5–10, 13–19, 18–22 and 21–24) were novel; two LGRs (deletion of exons 5–14 and 21–22) belong to the already described Czech-specific mutations; one LGR (deletion of exons 1–2) was reported from several countries. The deletions of exons 1–17 and 5–14, identified each in four families, represented Czech founder mutations. The present study indicates that screening for LGRs in *BRCA1* should include patients from breast or ovarian cancer families as well as high-risk patients with non-familial cancer, in particular cases with early-onset breast or ovarian cancer. On the contrary, our analyses do not support the need to screen for LGRs in the *BRCA2* gene. Implementation of chromosome-specific aCGH could markedly facilitate the design of primers for amplification and sequence analysis of junction fragments, especially in deletions overlapping gene boundaries.

Keywords *BRCA1* gene · *BRCA2* gene · Large genomic rearrangements (LGR) · Hereditary breast and ovarian cancer syndrome · Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) · Chromosome-specific array comparative genomic hybridization (aCGH)

I. Ticha · Z. Kleibl · J. Stribrna · M. Zikan · P. Pohlreich (✉)
Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, U Nemocnice 5, 128 53 Prague 2, Czech Republic
e-mail: ppohl@lf1.cuni.cz

J. Kotlas
Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

M. Zimovjanova · M. Mateju
Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

M. Zikan
Department of Obstetrics and Gynecology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

Introduction

BRCA1 (MIM# 113705) and *BRCA2* (MIM# 600185) are major predisposition genes in hereditary breast and ovarian cancer. Frequency of germline *BRCA1/2* mutations was estimated at 2–4.7% in unselected breast cancer (BC) patients from different populations [1–3]. Pathogenic

Published online: 05 February 2010

alterations are predominantly represented by small deletions, insertions, and point mutations leading to premature termination of translation and production of truncated proteins. Deletions and duplications of large genomic regions or alterations that combine both deletion and insertion events have been increasingly reported during period following the introduction of multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) testing [4]. The majority of large genomic rearrangements (LGR) at the *BRCA1* locus are unique and their frequency is not expected to vary markedly among various geographic regions [5]. They represented 8–10% of all *BRCA1* mutations in several countries [5–10]. The elevated incidence of LGRs in certain ethnic groups is caused by founder effect. In Dutch population, deletions of exon 13 or 22 represented 36% (12/33) of all *BRCA1* mutations found in 170 families [11]. In another group of 805 Dutch patients, these two deletions were detected in 23.1% (28/121) of *BRCA1* positive cases and all LGRs accounted for 27.3% of *BRCA1* mutations [4]. High proportion of LGRs was also found in Italy where LGRs accounted for 19% of *BRCA1* mutations [12].

Most of LGRs are the result of unequal homologous recombination between *Alu* repeats accumulated at the *BRCA1* locus [13]. Numerous recombination sites in homologous regions located in the *BRCA1* gene and the *BRCA1* pseudogene (*ψBRCA1*) were described by Puget and colleagues [10, 14] and afterward by other authors [5].

Contrary to *BRCA1*, the germline *BRCA2* rearrangements have not been identified in several populations [15–17] and in other geographic areas occurred rarely [7, 9, 18, 19]. LGRs in the *BRCA2* gene were most frequent in families with multiple BC cases including one or more male BC cases [20, 21].

Rearrangements at the *BRCA1* locus represented 10.4% (10/96) of all *BRCA1* mutations identified in high-risk families in Moravia—the eastern part of the Czech Republic [22]. Further, one rearrangement in the gene was identified by RNA-based analysis performed in our previous study [23]. These results indicated that screening for LGRs in the *BRCA1* gene should be included in genetic testing in high-risk BC or ovarian cancer (OC) families. Nevertheless, only high-risk families were screened for LGRs at the *BRCA1* locus and LGRs within the *BRCA2* gene have not been analyzed at all in the Czech population. In this study, MLPA analysis was applied to determine the frequency and spectrum of LGRs in the *BRCA1/2* genes in a group of patients from BC and/or OC families and a group of high-risk patients not selected on the basis of their family history of cancer. Oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization (aCGH) was used for precise location of LGRs. The purpose of this study was to define reliable inclusion criteria for LGR testing.

Materials and methods

Patients and samples

Selection for genetic testing was performed between 2002 and 2009 at the Institute of Biology and Medical Genetics, at the Department of Oncology and at the Department of Obstetrics and Gynecology of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague. Selection criteria for *BRCA1/2* testing followed the national guidelines approved by the Czech Society for Oncology and the Czech Society for Medical Genetics published in 2003 and updated in 2009 [24, 25].

A series of 655 patients was first analyzed for the presence of point mutations and small deletions or insertions in *BRCA1/2* genes as described previously [26, 27] and those tested negative for mutations in coding gene regions were subsequently screened for LGRs at *BRCA1/2* loci. This series represented 521 cases including (i) 239 patients from high-risk families (referred herein as familial/hereditary cancer cases) and (ii) 282 patients selected regardless of the absence of reported family history of cancer (referred herein as sporadic/non-familial cancer cases). The first group met the following criteria in first- or second-degree relatives: two cases of either BC diagnosed before the age of 50 or OC diagnosed at any age; and three or more cases of BC or OC diagnosed at any age. A total of 161 families had a history positive for BC only (HBC families), 69 families had both BC and OC (HBOC families) and 9 families had OC only (HOC families). The second group included patients diagnosed with BC before the age of 36 (138 cases) or OC before the age of 40 (64 cases), patients with bilateral BC before the age of 51 (27 cases), patients with both primary breast and ovarian cancer (18 cases) or medullary breast carcinoma (19 cases) and cases of male BC (16 cases). The study was approved by the Ethical Committee of the First Faculty of Medicine and the General University Hospital and all participants gave their written informed consent prior to genetic testing.

Genomic DNA was isolated from EDTA blood samples using the Wizard Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI) according to the supplier's instructions.

Mutation probabilities calculation

In order to compare detected mutation frequencies in analyzed groups with expected mutation frequencies, we retrospectively calculated mutation probabilities in *BRCA1/2* genes using BRCAPRO BayesMendel model [28] with CancerGene software package (CaGene version 5.0; University of Texas Southwestern Medical Center) available at http://www4.utsouthwestern.edu/breasthealth/cagene/.

MLPA analysis

The SALSA MLPA kits for *BRCA1* (the primary screening kit P002B and the confirmatory kit P087) and *BRCA2* (kit P045-B1; MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) were used for relative quantification of each of the *BRCA1/2* exons according to the manufacturer's instructions. Amplified products were separated on an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). The collected data were analyzed using Gene Mapper *v*4.0 Software (Applied Biosystems) and evaluated by both visual comparison of chromatograms and quantitative comparison of peak areas exported to Excel spreadsheet. Samples differing in a relative peak area by more than 30% were reanalyzed with the P087 kit. Samples with single exon deletion were sequenced to exclude the presence of sequence variants affecting probe hybridization.

Array-based comparative genomic hybridization

The chromosome 17-specific aCGH (Roche NimbleGen, Madison, USA) was used to locate deletion breakpoints in regions flanking the *BRCA1* gene. The arrays format was 385 K; median oligonucleotide probe (50–75 mer) spacing was 160 bp.

Sample and reference DNA (from blood samples of 100 random blood donors) were fragmented by sonication and further processed according to the supplier's protocol (Roche NimbleGen). Briefly, 1 μg of sample DNA was labeled with Cy3- and the same amount of reference DNA with Cy5-dye using a NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kit. Differentially labeled DNA samples were purified, combined (6 μg of each labeled DNA) and hybridized to arrays for 18 h at 42°C. The slides were washed, dried, and fluorescence was recorded at 3 μm resolution using microarray fluorescent scanner Innoscan 700 (INNOPSYS, France). Scanned images were analyzed using NimbleScan software. Fluorescence signals were normalized with qspline algorithm [29] to compensate for inherent differences in signal between the two dyes. Copy number analysis was performed using the segMNT algorithm [30], and statistically significant regions of aberration were visualized using SignalMap software (Roche NimbleGen).

DNA breakpoint analysis

Large deletions detected by MLPA and located by aCGH were validated by identification and characterization of the genomic breakpoints. Long-range PCR (LR-PCR) implementing Expand Long Template PCR System (Roche Applied Science) was performed according to the manufacturer's instructions with primers flanking the breakpoints (Table 1) to amplify the junction fragment carrying

Table 1 Primers used for amplification of junction fragments

Exon (length of deletion)	Primers (forward and reverse)	Position of primers[a/b]	Amplified junction fragment (kb)	Detection method
1A–2	[1]F: ACCTAAAATTCCTTCTGCTGGAC	197249–235352[a]	1.2	MLPA, LR-PCR
(36.934 kb)	R: CAAAGAACGACTAACCTGGCA			
1–17	F: TATCCCAGTGACTTTCCAGC	208205–290011[a]	1.3	MLPA, aCGH, LR-PCR
(80.496 kb)	R: TGAGAGGGATGGGAGAATAC			
5–10	F: AGGCAGTCATGCATTAGTTTG	17563–33895[b]	0.8	MLPA, LR-PCR
(15.552 kb)	R: CCGTCTCAGAAAATTCACAAG			
5–14	[2]F: CCTTACCTACCTACATTCAC	19244–54463[b]	3.6	MLPA, LR-PCR
(31.583 kb)	R: CTTTATGTAGGATTCAGAGTA			
13–19	F: ACCAGTTTATGCTCTTCCAG	41617–67533[b]	0.7	MLPA, LR-PCR
(25.201 kb)	R: GCCTATAAGATGCATTCCCT			
18–22	F: GCTCGTGTACAAGTTTGCCAGA	61040–81093[b]	3.7	MLPA, aCGH, LR-PCR
(16.316 kb)	R: ATGGAAGCCATTGTCCTCTGTC			
21–22	F: AGCATGATTTTGAAGTCAGAGGAG	71596–81074[b]	5.9	cDNA analysis, LR-PCR
(3.779 kb)	R: GTCCAGGCATCTGGCTGCACAACCACAA			
21–24	F: TTATCTCATAACTAGGCATCC	75369–101263[b]	0.3	MLPA, aCGH, LR-PCR
(25.639 kb)	R: TTCCTGAAAGTCCTCAGAGC			

[1–2] Primers according to [1] Preisler-Adams et al. [16]; [2] Vasickova et al. [22]

[a] GenBank reference sequence NC_000017.9 complement (38300000..38760000)

[b] GenBank reference sequence L78833.1

the deletion. The junction fragments of previously reported rearrangements were obtained with published primers [16, 22, 23]. Amplified PCR fragments were separated on agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. PCR products, corresponding to the deleted allele, were purified with ExoSAP-IT (USB Corp., Cleveland, USA) according to the manufacturer's instructions and sequenced using the BigDye *v*3.1 terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI 3130 genetic analyzer.

Nomenclature of mutations

Mutations were described according to the recommended nomenclature system described by the Human Genome Variation Society (HGVS) [31]. Designation of the genomic rearrangements in the *BRCA1* gene is based on the reference sequence L78833.1; deletions of exons 1–17 and exons 1–2 on the reference sequence NC_000017.9 complement (38300000..38760000) [32]. Whole genomic locale is from March 2006 assembly of the UCSC Genome Browser on Human, NCBI Build 36.1 (available at http://genome.ucsc.edu).

Haplotype analysis

DNA samples carrying deletion of exons 1–17 or 5–14 in the *BRCA1* gene were genotyped for two *BRCA1* intragenic microsatellite markers (D17S855, D17S1322), and two markers (D17S1320, D17S1325) flanking *BRCA1* gene on the centromeric and telomeric side, respectively. Each marker was amplified by PCR using FAM-labeled forward primers as described previously [33] and analyzed on an ABI 3130 genetic analyzer.

Results

Prevalence of genomic rearrangements in *BRCA1/2* genes

LGRs were examined in 521 unrelated patients negative for *BRCA1* and *BRCA2* point mutations. A series of 239 high-risk patients was selected from 161 HBC families and 78 HBOC or HOC families. A second series of 282 participants represented non-familial cancer cases. MLPA analysis revealed 8 different LGRs in *BRCA1* gene in 14 (2.7%, 14/521) probands (Table 2). The frequency of LGRs in the whole group of *BRCA1/2* tested patients (including 134 patients with small mutations) was 2.1% (14/655) (Table 3). Deletions were detected in the entire *BRCA1* locus and varied in size from less than 4 kb to more than 80 kb. The five rearrangements detected in eight families were novel (Fig. 1). One of the identified mutations (deletion of exons 1–2) occurred repeatedly in several countries [5, 7, 14, 34, 35]; two other mutations (deletion of exons 5–14 and 21–22) have already been detected in the Czech population [22, 23]. No LGRs were identified in the *BRCA2* gene in 521 analyzed samples of high-risk patients.

LGRs were significantly more frequent in the group of patients from high-risk families (12/239, 5.0%) compared to the group of non-familial cancer cases (2/282, 0.7%, $P = 0.002$). In high-risk families, the frequency of LGRs was higher among patients from HBOC and HOC families (6/78, 7.7%) than that from HBC families (6/161, 3.7%, $P = 0.2$). Similar to LGRs, the highest frequency of *BRCA1* point mutations was also found in a group of HBOC and HOC families (Table 3). Among non-familial cancer cases two LGRs were found, a deletion of exons 5–14 in a woman diagnosed with medullary BC at the age of 39 and a deletion of exons 21–22 in a woman with OC at the age of 36.

In total, 14 large deletions or complex rearrangements were detected at the *BRCA1* locus in 521 independent families, which accounted for 12.3% (14/114) out of all identified *BRCA1* mutations (Table 3). In order to compare the number of actually detected mutations in *BRCA1* gene with expected mutation frequencies in our study groups, we implemented BRCAPRO computational model to retrospectively estimate the likelihood of finding germline *BRCA1* mutations. Compared to BRCAPRO, we obtained slightly higher frequencies of *BRCA1* mutations in all analyzed patients and in high-risk families and non-familial cancer cases subgroups (Table 4). Small discrepancies in mutation rates may be influenced by the fact that the BRCAPRO can underpredict the numbers of mutations, especially in low carrier probability categories [36–38].

Characterization of LGRs and determination of breakpoints

Specification of families with identified mutations and characterization of LGRs are described in Table 2. A deletion of exons 1–2 was found in a woman from HBOC family No 779. Sequencing of the junction fragment amplified from a patient DNA sample revealed a deletion of 36,934 bp (g.197575_234508del36934) with identical breakpoints as described previously in families from the USA [14], Italy [34], and Germany [7]. A deletion of exons 5–14 was identified in two high-risk HBOC families, one HBC family encompassing four BC cases (including two bilateral BC cases) and one sporadic BC patient with medullary BC. LR-PCR and sequence analysis of the amplified junction fragment confirmed in all four cases a deletion of 31,583 nucleotides (g.21716_53298del31583) resulting in an in frame deletion of 1,450 amino acids, which was detected in four patients from Moravia, Czech Republic [22] and in one from Germany [7]. In frame deletion involving exons 21–22

Table 2 Germline rearrangements in the *BRCA1* gene

Exon	Chromosomal breakpoints[a], mut. designation – gDNA[b/c], mut. designation – cDNA[d]	Predicted mutation effect	Recombination	Patient no.	BC & OC cases[e] (age at diagnosis)	Other tumors	References
1A–2	chr17:38,525,493–38,562,426[a] g.197575_234508del36934[b] c.1-32787_80+4067del36934[d]	No transcript?	*ΨBRCA1*/*BRCA1*	779	BC (**58***); OC (**51***, 47)	–	[7, 14, 34]
1–17	chr17:38,470,578–38,551,073[a] g.208928_289423del80496[b] c.1-21434_5075-1084del80496[d]	Loss of ~90% of coding sequence	*Alu*Y/*Alu*Y	206 225 269 416	BC (**28**, 50, 50) BC (27); OC (**40**) BC (**35**, 36) BC (39, 62*); OC (**42**, 64*)	Uterus (3x) Colon, lung – Lymphoma	Novel
5–10	chr17:38,501,028–38,516,581[a] g.17696_33247del15552ins35[c] c.135-4505_670+361del 15552ins35[d]	p.Lys45Asn fsX3	*Alu*Sx/*Alu*Y/*Alu*Jb	1190	BC (50, 50); OC (**46**)	–	Novel
5–14	chr17:38,480,980–38,512,561[a] g.21716_53298del31583[c] c.135-485_4485-913del31583[d]	p.Lys45_Lys1495del	LINE/–	278 453 862 938	BC (**40**/**41**, 63, 69, 35/35) BC (**39**) BC (**44**, 48*); OC (60, 64*) BC (**32**, ?*, ?); OC (?*)	Pancreas, uterus – Prostate –	[7, 22]
13–19	chr17:38,467,226–38,492,424[a] g.41850_67050del25201[c] c.4185+4062_5193+1650del 25201[d]	p.Gln1396_Glu1731del	–/*Alu*Sx	571	BC (**56**/**56**, 48, 44)	–	Novel
18–22	chr17:38,454,318–38,470,629[a] g.63647_79962del16316[c] c.5075-1135_5046+347del16316[d]	p.Asp1692Gly fsX26	*Alu*Y/*Alu*Sx	897	BC (**35**, 64, ?, ?, ?, ?)	–	Novel
21–22	chr17:38,453,374–38,457,152[a] g.77128-80906del3779ins236[c] c.5278-492_5407-128del 3779ins236[d]	p.Ile1760_Thr1802del	*Alu*Sx/*Alu*Jb	102	OC (**36**)	–	[22, 23]
21–24	chr17:38,433,150–38,458,787[a] g.75489_101127del25639insTAG[c] c.5278-2135_5592+18067del 25639insTAG[d]	No transcript? p.Ile1760fs	–/–	609	BC (**38**, ?, ?)	–	Novel

[a] Genomic locale for chromosome 17 is from the UCSC genome browser, Mar 2006 assembly

[b] GenBank reference sequence covering the analyzed region: NC_000017.9 complement (38300000..38760000)

[c] GenBank reference sequence L78833.1

[d] Mutation numbering: +1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence U14680

[e] BC and/or OC cases in proband and relatives

Age of onset in proband is indicated in *bold underlined* numerals; asterisks (*) mark the patient with both BC and OC; ages at diagnosis of bilateral BC cases are separated by a slash (/)

and simultaneous insertion of a 236-bp intronic fragment into the site of a deleted sequence (g.77128_80906del3779ins236) was detected once in our laboratory [23] and two times in Moravia [22].

A large deletion affecting exons 1–17 was identified in two HBC families and in two high-risk HBOC families. Chromosome 17-specific aCGH was used to map accurately borders of the deletion extending the 5′ boundary of the *BRCA1* gene, which enabled precise design of PCR primers and sequencing of breakpoints (Fig. 2a). Junction fragments of 1,311 bp were obtained from patients' genomic DNA with primers spanning the region from the end of

Table 3 Frequencies of genetic changes in relation to classification of patients and families

Classification	Number of families/patients	Small mutations in *BRCA1* (%)	Small mutations in *BRCA2* (%)	LGRs in families in the study (%)	LGRs in families negatively tested for *BRCA1/2* mutation (%)
High-risk families	344	74 (21.5)	31 (9.0)	12 (3.5)	12/239 (5.0)
HBC families	*206*	*26 (12.6)*	*19 (9.2)*	*6 (2.9)*	*6/161 (3.7)*
HBOC + HOC families	*138*	*48 (34.8)*	*12 (8.7)*	*6 (4.3)*	*6/78 (7.7)*
Sporadic cases	311	26 (8.4)	3 (1.0)	2 (0.6)	2/282 (0.7)
Overall	655	100 (15.3)	34 (5.2)	14 (2.1)	14/521 (2.7)

HBC hereditary breast cancer, *HBOC* hereditary breast and ovarian cancer, *HOC* hereditary ovarian cancer

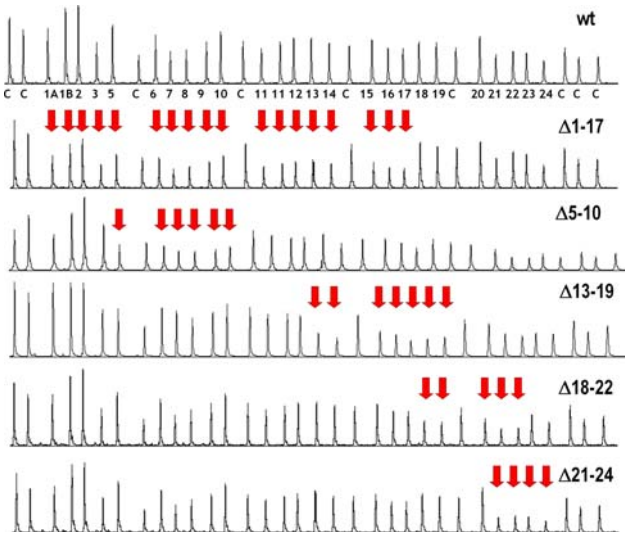


Fig. 1 Five novel deletions in *BRCA1* gene identified by MLPA analysis. Control sample is indicated by wt, numbers denote exons of *BRCA1*, C—control DNA sequences. *Arrows* indicate exons interpreted as deleted

Table 4 The mean predicted probabilities calculated using BRCAPRO and actual occurrence of *BRCA1* mutations

Classification	Number of families/patients	Mutations in *BRCA1* (%)	BRCAPRO mean (±SD) Range
High-risk families	344	86 (25.0)	0.229 (±0.269) 0.001–0.975
Sporadic cases	311	28 (9.0)	0.086 (±0.122) 0.001–0.838
Overall	655	114 (17.4)	0.162 (±0.225) 0.001–0.975

the *NBR2* gene to intron 17 of *BRCA1*. Sequence analysis of amplified fragments revealed a deletion of 80,496 bp (g.208928_289423del80496) in all four families with breakpoints occurring in a 37-bp region of identical sequence within two *Alu*Y repeats located more than 20 kb upstream of the *BRCA1* translation start site and in intron 17 of *BRCA1*. The deletion spanned more than 90% of the *BRCA1* coding sequence together with coding sequence of the *NBR2* gene. The deletion of exons 1–17 was also described in Sweden [18], but the alteration had different breakpoints and included 284,479 bp.

A complex recombination event characterized by the deletion of exons 5–10 and the insertion of a short nucleotide stretch derived from the sequence in intron 3 of the *BRCA1* gene (Fig. 3) was identified in a HBOC family No 1190. With PCR primers located in introns 3 and 10, a fragment of 816 bp was amplified from patient's DNA but not from control DNA. Sequencing of the PCR product ascertained a deletion of 15,552 bp with concurrent insertion of a 35-bp fragment (g.17696_33247del15552ins35). Deletion breakpoints were found in the *Alu*Sx and *Alu*Jb sequences located in introns 3 and 10, respectively. Inserted fragment corresponded to the reverse complement of the sequence derived from *Alu*Y repeat located in intron 3 of *BRCA1* (g.18725-18759). Breakpoints were located in a sequence comprising 10 identical nucleotides within *Alu*Sx (g.17686-17695) and *Alu*Y (g.18760-18769) repeats in intron 3 and a stretch of 29 identical nucleotides located in the *Alu*Y (g. 18696-18724) and *Alu*Jb (g.33248-33276) repeats in introns 3 and 10, respectively. The complex rearrangement led to the loss of exons 5–10 that caused a shift in the reading frame and truncation of the BRCA1 protein (p.Lys45AsnfsX3).

A deletion comprising exons 13–19 was found in a woman with bilateral BC from HBC family No 571. The specific junction fragment of 716 bp was obtained from patient's DNA using primers located in introns 12 and 19 (Fig. 4). Sequence analysis identified a deletion of 25,201 bp (g.41850_67050del25201). Despite the deletion of exons 13–19 maintains the *BRCA1* reading frame, elimination of the gene region coding for 336 amino acids (p.Gln1396_Glu1731del) is probably of pathogenic nature. The deleted region comprises the substantial part of the functional BRCT (*BRCA1* C-terminal) domain (amino acid residues 1,646–1,859) [39] affected by several reported missense and nonsense mutations associated with BC [40].

In HBC family No 897 affected with six cases of BC, a deletion of exons 18-22 was revealed. Chromosome

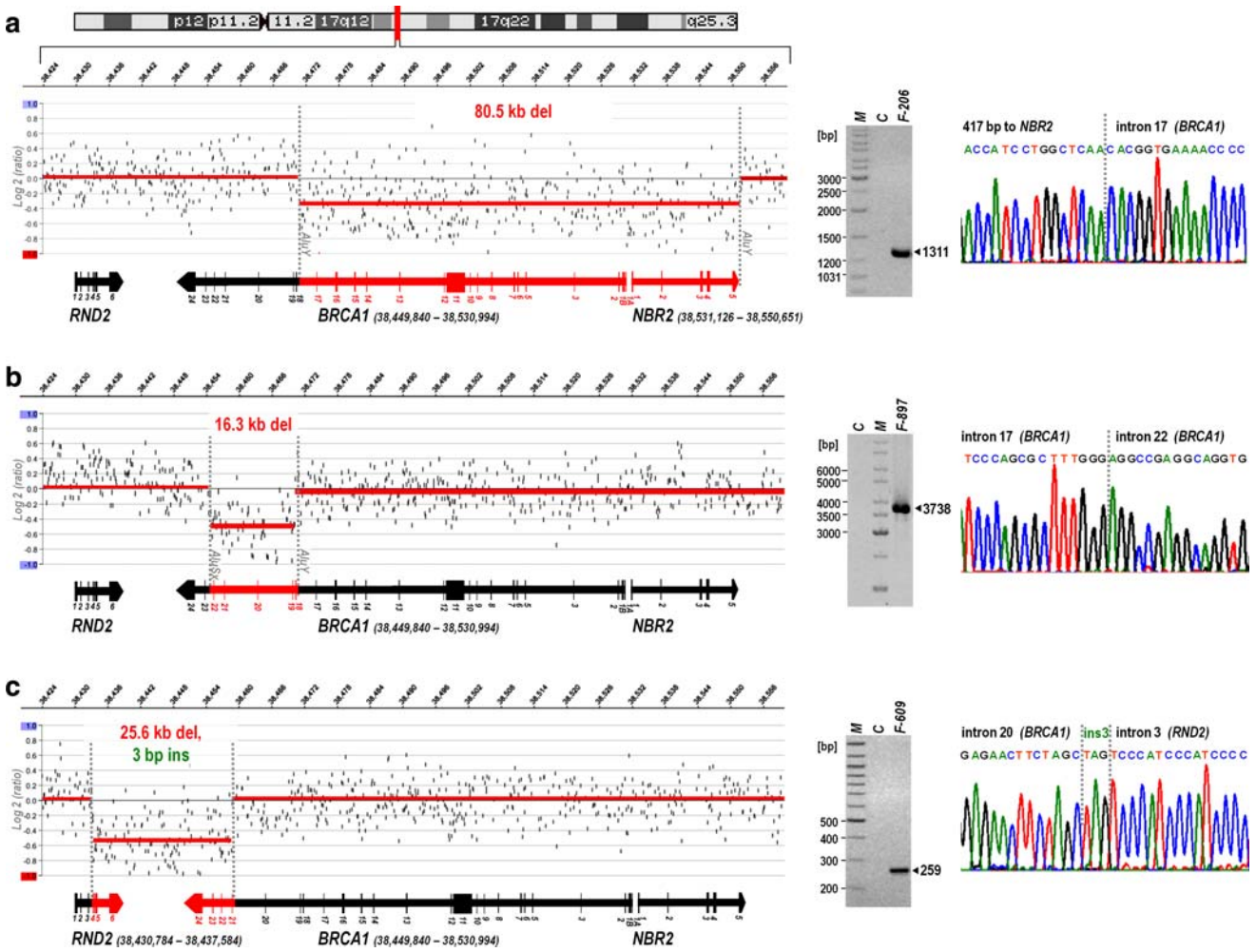


Fig. 2 Breakpoint analysis of three novel genomic rearrangements. *Left*—copy number analysis at the *BRCA1* locus by aCGH. The *y*-axis indicates log2 ratios of Cy5/Cy3 fluorescent intensity. *Red lines* represent the results of segMNT analysis. Deleted regions are shown by *lower red lines*. The schemes show the position and orientation of *BRCA1*, *NBR2*, and *RND2* genes and position of deleted regions (in *red*). Genomic locale is from the UCSC genome browser, Mar 2006 assembly. *Right*—analysis of PCR products on agarose gels and breakpoint verification by sequencing. Carriers of the deletion are indicated by numbers; lane C—negative control; lane M—size standards. Breakpoints are indicated by *dashed lines*. **a** *Alu*-mediated 80.5-kb deletion comprising exons 1–17 and the *NBR2* gene; **b** *Alu*-mediated 16.3-kb deletion comprising exons 18–22; **c** a 25.6-kb deletion spanning exons 21–24 and the last three exons of *RND2* gene. For figure in color see the online version of the article

17-specific aCGH was used to map the deletion breakpoints (Fig. 2b). LR-PCR with primers located in introns 17 and 22 amplified a family specific fragment of 3,738 bp. Sequencing of the junction fragment showed that recombination took place at highly homologous *Alu*Y and *Alu*Sx sequences in introns 17 and 22 and demonstrated a deletion of 16,316 bp (g.63647_79962del16316). Out of frame deletion of exons 18–22 predicted truncation of the BRCA1 protein (p.Asp1692GlyfsX26).

A deletion of exons 21–24 was revealed in a woman from HBC family No 609 with invasive BC diagnosed at the age of 38. Chromosome 17-specific aCGH analysis localizes the deletion breakpoints in intron 20 and in a region of about 18 kb downstream of the *BRCA1* stop codon (Fig 2c). Primers were designed to amplify a specific junction fragment of 259 bp from patient's DNA sample. Sequence analysis demonstrated the recombination of non-homologous sequences leading to the deletion of 25,639 nucleotides and the insertion of a trinucleotide TAG (g.75489-101127del25639insTAG). Due to homozygosity in the coding region of the gene, study of allelic expression was not possible, however, monoallelic expression of the *BRCA1* gene was observed in a patient with the deletion involving exon 24 [7]. In addition, the deleted gene region coding for terminal 104 amino acid residues includes an essential part of the C-terminal BRCT domain of the BRCA1 protein. The similar deletion of exons 21–24 was also described in the USA in a family with Irish ancestry

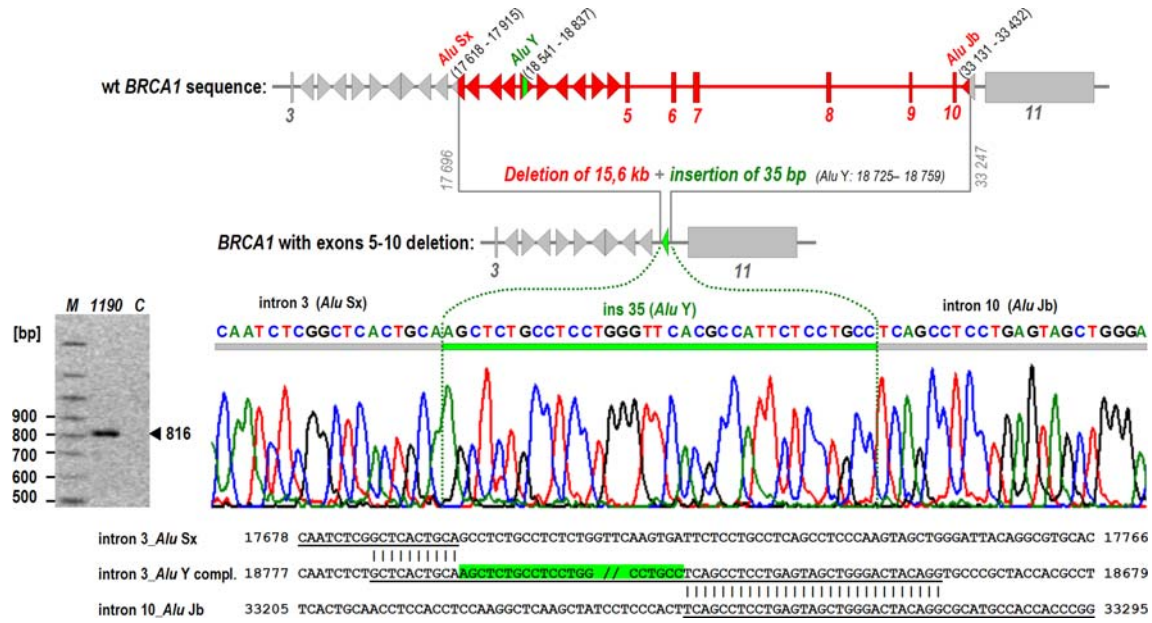


Fig. 3 Breakpoint analysis of a complex genomic rearrangement comprising deletion of exons 5–10 and insertion of 35 nucleotides using LR-PCR (*left*) and sequencing (*right*). The carrier of the deletion is indicated by a number; lane C—negative control; lane M—size standards. Breakpoints verified by sequencing are indicated by *dashed lines*. The upper part of the scheme shows the deleted sequence in *red*; exons are denoted as *red bars*; position (out of scale) and orientation of *Alu*-elements are indicated by *arrowheads*. *Alu*-elements involved in rearrangement are labeled. Sequence coordinates are according to the GenBank reference sequence L78833.1. The lower part of the scheme shows sequences upstream and downstream to the breakpoints. Identical sequences, where the recombination events occur, are indicated by vertical lines. The *green box* highlights an insert of 35-bp. The *underlined* sequence corresponds to the junction fragment. For figure in color see the online version of the article

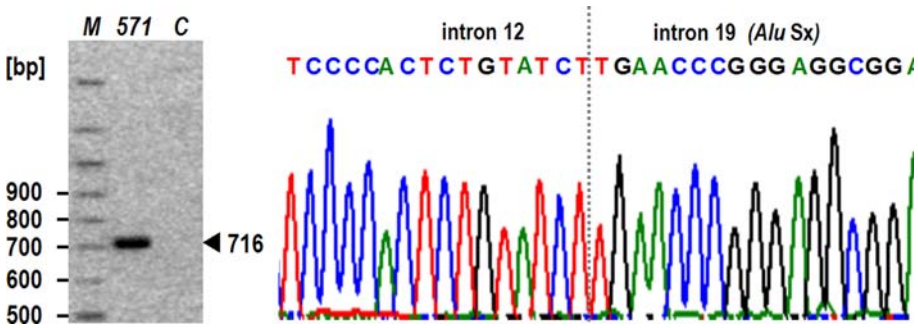


Fig. 4 Breakpoint analysis of a 25.2-kb deletion of exons 13–19 by LR-PCR (*left*) and sequencing (*right*). The carrier of the deletion is indicated by a number; lane C—negative control; lane M—size standards. Breakpoints verified by sequencing are indicated by *dashed line*

[41], but in this 19,245-bp long deletion, *Alu* repeats were involved in recombination.

Analysis of *BRCA1* haplotypes

In order to evaluate whether the repeatedly occurring deletions in the *BRCA1* gene involving exons 1–17 and 5–14 (both found in four families) represent founder mutations, haplotype analysis was performed in families carrying these alterations. One specific ~756-kb haplotype defined by D17S855, D17S1322, D17S1320, and D17S1325 markers was common for each carrier with a given type of alteration, which indicates the same origin for each mutation (Table 5).

Discussion

The frequency of LGRs in our study (12.3% of all mutations found in *BRCA1* gene) was lower than that observed in the Netherlands (27.3%) [4] and Italy (19%) [12], but it was in agreement with data reported from Denmark (12.5%) [9], France (12%) [8], Germany (9.6%) [7], and Spain (8.2%) [6]. Frequency of LGRs described in Moravia (10.4% of all detected *BRCA1* mutations) [22] was similar to our results. However, only two mutations (deletions of exons 5–14 and 21–22) were identical in both parts of the country. The Czech-specific mutations, deletions of exons 1–17 and 5–14 in the *BRCA1* gene, comprised more than 50% (8/14) of identified LGRs in our study. While the

Table 5 Haplotype association with deletion of exons 1–17 and 5–14

Patient no.	D17S1325	D17S1322	D17S855	D17S1320
Del ex 1-17				
206	[a]**186** 194	**115** 124	**147** 139	**167** 171
225	**186** 192	**115** 115	**147** 145	**167** 173
269	**186** 194	**115** 115	**147** 141	**167** 173
416	**186** 192	**115** 115	**147** 145	**167** 169
Del ex 5-14				
278	**192** 188	**115** 121	**145** 139	**173** 160
453	**192** 200	**115** 118	**145** 143	**173** 173
862	**192** 194	**115** 115	**145** 147	**173** 169
938	**192** 204	**115** 118	**145** 139	**173** 179

[a] Sizes of microsatelite markers (bp)

occurrence of exon 1–17 deletion was restricted to the Prague area so far, the deletion of exons 5–14 was also detected four times in Moravia and likely represents the most frequent LGR in the Czech Republic. The complex rearrangement involving deletion of exons 21–22 was identified two times in Moravia and once in our laboratory and may represent further population specific *BRCA1* mutation. Nevertheless, haplotype analysis was not carried out in affected families. The deletion of exons 1–2 was the only identified mutation spread throughout Europe [5]. In the presented study, five novel LGRs were found. Frequent occurrence of unique mutations is in agreement with the results obtained from other countries [5].

The whole group of 521 high-risk patients was tested for LGRs in the *BRCA2* gene, however, no alterations were found. Very low frequency of LGRs was reported from Germany, where a gross rearrangement in the *BRCA2* gene was found only in one family with male BC out of 450 analyzed families [7]. In Denmark, a group of 642 patients was screened for LGRs and one deletion in *BRCA2* was also described in a family with male BC [9]. Higher frequency of rearrangements in the *BRCA2* gene was found in Spain (2/20) [20] and France (3/39) [21] in families with female and male BC. In our study, only a small group of 5 families with female and male BC was analyzed with negative results for rearrangements in *BRCA2*. On the other hand, our results are not in agreement with analyses performed in France [42], Spain [20], and the USA [41] where genomic rearrangements of the *BRCA2* gene have been found in families with no male BC cases.

Homologous recombination between *Alu* sequences is associated with most reported rearrangements at the *BRCA1* locus [5]. High percentage of LGRs identified in our study group of patients was also caused by recombination of *Alu* repeats (Table 2). Deletions of exons 5–14, 13–19 and 21–24 were not mediated by *Alu/Alu* recombination and the deletion of exons 1–2 resulted from recombination of a sequence in intron 2 of the *BRCA1* gene with the homologous sequence from the *ψBRCA1* gene [14].

Sequencing of the junction fragment amplified by LR-PCR that confirms MLPA results and characterizes deletion breakpoints is a necessary step in the LGR analysis. However, location of the breakpoints and PCR amplification may fail when the deletion interferes with large introns or regions beyond the gene boundaries, where the location of the breakpoints may be difficult. In tested carriers, we initially failed to amplify specific junction fragments in two novel LGRs with borders located in regions adjacent to the *BRCA1* gene (deletions comprising exons 1–17 and 21–24). Chromosome-specific aCGH with a high density of oligonucleotide probes is a method that enables accurate mapping of the deleted region. In this study, we implemented commercially available chromosome 17-specific oligonucleotide arrays (Roche NimbleGen) that have comparable density of probes as custom made arrays described recently [18]. The technique was validated by analysis of a sample with already identified breakpoints (deletion of exons 18–22) and consequently two novel *BRCA1* rearrangements with unknown boundaries were analyzed. In all cases, the range of the deletion was accurately mapped, which enabled convenient PCR design and amplification of a short junction fragment (less than 1,500 bp) suitable for sequence analysis (Fig. 2). The sample No 609 with deleted exons 21–24 (deletion of 25.639 kb) was tested by both chromosome-specific (median probe spacing $\sim$ 160 bp) and whole-genome aCGH (median probe spacing $\sim$ 7000 bp) (Roche NimbleGen). The deletion was identified by chromosome-specific aCGH, while the resolution power of the whole-genome aCGH with lower density of oligonucleotide probes was not satisfactory (data not shown).

In conclusion, analysis performed in 521 high-risk families and patients with non-familial cancer demonstrated that LGRs at the BRCA1 locus account for 12.3% of all disease-causing mutations found in the *BRCA1* gene. The two Czech-specific founder mutations, the deletions of exons 1–17 and 5–14, were dominant gene alterations. Our results indicate that screening for LGRs in the *BRCA1* gene performed in high-risk families can also be recommended to patients with non-familial cancer; in particular cases with early-onset BC or OC. Screening for LGRs in BRCA2 may be restricted to high-risk families with male breast cancer, in which large rearrangements were identified in several studies. Characterization of deletion breakpoints belongs to essential steps in analysis of LGRs that could be substantially improved by chromosome-specific aCGH suitable for accurate detection of deletion boundaries.

Acknowledgments We thank Marie Epsteinova for her excellent technical assistance. Special thanks go to Zbynek Halbhuber PhD

from KRD Molecular Technologies, who performed experiments with the oligonucleotide-based array CGH technique. This project was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, Grant No. NS 10304-3/2009; and the Ministry of Education Youth and Sports Research Project: MSM 0021620808.

References

1. Anglian Breast Cancer Study Group (2000) Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Br J Cancer 83:1301–1308
2. Malone KE, Daling JR, Doody DR, Hsu L, Bernstein L, Coates RJ, Marchbanks PA, Simon MS, McDonald JA, Norman SA, Strom BL, Burkman RT, Ursin G, Deapen D, Weiss LK, Folger S, Madeoy JJ, Friedrichsen DM, Suter NM, Humphrey MC, Spirtas R, Ostrander EA (2006) Prevalence and predictors of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of breast cancer in white and black American women ages 35 to 64 years. Cancer Res 66:8297–8308
3. Mateju M, Stribrna J, Zikan M, Kleibl Z, Janatova M, Kormunda S, Novotny J, Soucek P, Petruzelka L, Pohlreich P (2010) Population-based study of BRCA1/2 mutations: family history based criteria identify minority of mutation carriers. Neoplasma 57(4)
4. Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Pruntel R, Regnerus R, van Welsem T, van Spaendonk R, Menko FH, Kluijt I, Dommering C, Verhoef S, Schouten JP, van't Veer LJ, Pals G (2003) Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. Cancer Res 63:1449–1453
5. Mazoyer S (2005) Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. Hum Mutat 25:415–422
6. de la Hoya M, Gutierrez-Enriquez S, Velasco E, Osorio A, Sanchez de Abajo A, Vega A, Salazar R, Esteban E, Llort G, Gonzalez-Sarmiento R, Carracedo A, Benitez J, Miner C, Diez O, Diaz-Rubio E, Caldes T (2006) Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer. Clin Chem 52:1480–1485
7. Engert S, Wappenschmidt B, Betz B, Kast K, Kutsche M, Hellebrand H, Goecke TO, Kiechle M, Niederacher D, Schmutzler RK, Meindl A (2008) MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. Hum Mutat 29:948–958
8. Gad S, Caux-Moncoutier V, Pages-Berhouet S, Gauthier-Villars M, Coupier I, Pujol P, Frenay M, Gilbert B, Maugard C, Bignon YJ, Chevrier A, Rossi A, Fricker JP, Nguyen TD, Demange L, Aurias A, Bensimon A, Stoppa-Lyonnet D (2002) Significant contribution of large BRCA1 gene rearrangements in 120 French breast and ovarian cancer families. Oncogene 21:6841–6847
9. Hansen TV, Jonson L, Albrechtsen A, Andersen MK, Ejlertsen B, Nielsen FC (2009) Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. Breast Cancer Res Treat 115:315–323
10. Puget N, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova OM, Pages S, Lynch HT, Lenoir GM, Mazoyer S (1999) Screening for germ-line rearrangements and regulatory mutations in BRCA1 led to the identification of four new deletions. Cancer Res 59:455–461
11. Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drusedau M, Hogervorst FB, Hageman S, Arts PJ, Ligtenberg MJ, Meijers-Heijboer H, Klijn JG, Vasen HF, Cornelisse CJ, 't Veer LJ, Bakker E, van Ommen GJ, Devilee P (1997) BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. Nat Genet 17:341–345
12. Agata S, Viel A, Della PL, Cortesi L, Fersini G, Callegaro M, Dalla PM, Dolcetti R, Federico M, Venuta S, Miolo G, D'Andrea E, Montagna M (2006) Prevalence of BRCA1 genomic rearrangements in a large cohort of Italian breast and breast/ovarian cancer families without detectable BRCA1 and BRCA2 point mutations. Genes Chromosomes Cancer 45:791–797
13. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, Hood L, King MC (1996) Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. Genome Res 6:1029–1049
14. Puget N, Gad S, Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S (2002) Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot. Am J Hum Genet 70: 858–865
15. Buffone A, Capalbo C, Ricevuto E, Sidoni T, Ottini L, Falchetti M, Cortesi E, Marchetti P, Scambia G, Tomao S, Rinaldi C, Zani M, Ferraro S, Frati L, Screpanti I, Gulino A, Giannini G (2007) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in a cohort of consecutive Italian breast and/or ovarian cancer families. Breast Cancer Res Treat 106:289–296
16. Preisler-Adams S, Schonbuchner I, Fiebig B, Welling B, Dworniczak B, Weber BH (2006) Gross rearrangements in BRCA1 but not BRCA2 play a notable role in predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk families of German origin. Cancer Genet Cytogenet 168:44–49
17. Pylkas K, Erkko H, Nikkila J, Solyom S, Winqvist R (2008) Analysis of large deletions in BRCA1, BRCA2 and PALB2 genes in Finnish breast and ovarian cancer families. BMC Cancer 8:146
18. Staaf J, Torngren T, Rambech E, Johansson U, Persson C, Sellberg G, Tellhed L, Nilbert M, Borg A (2008) Detection and precise mapping of germline rearrangements in BRCA1, BRCA2, MSH2, and MLH1 using zoom-in array comparative genomic hybridization (aCGH). Hum Mutat 29:555–564
19. Agata S, Dalla PM, Callegaro M, Scaini MC, Menin C, Ghiotto C, Nicoletto O, Zavagno G, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E, Montagna M (2005) Large genomic deletions inactivate the BRCA2 gene in breast cancer families. J Med Genet 42:e64
20. Gutierrez-Enriquez S, de la Hoya M, Martinez-Bouzas C, Sanchez dA, Cajal T, Llort G, Blanco I, Beristain E, Diaz-Rubio E, Alonso C, Tejada MI, Caldes T, Diez O (2007) Screening for large rearrangements of the BRCA2 gene in Spanish families with breast/ovarian cancer. Breast Cancer Res Treat 103:103–107
21. Tournier I, Paillerets BB, Sobol H, Stoppa-Lyonnet D, Lidereau R, Barrois M, Mazoyer S, Coulet F, Hardouin A, Chompret A, Lortholary A, Chappuis P, Bourdon V, Bonadona V, Maugard C, Gilbert B, Nogues C, Frebourg T, Tosi M (2004) Significant contribution of germline BRCA2 rearrangements in male breast cancer families. Cancer Res 64:8143–8147
22. Vasickova P, Machackova E, Lukesova M, Damborsky J, Horky O, Pavlu H, Kuklova J, Kosinova V, Navratilova M, Foretova L (2007) High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangements in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic. BMC Med Genet 8:32
23. Zikan M, Pohlreich P, Stribrna J, Kleibl Z, Cibula D (2008) Novel complex genomic rearrangement of the BRCA1 gene. Mutat Res 637:205–208
24. Bartonkova H, Foretová L, Helmichová E, Kalábová R, Kleibl Z, Konopásek B, Krutílková V, Macháčková E, Novotný J, Petráková K, Petruželka L, Plevová P, Pohlreich P, Rob L, Skovajsová M, Veselý J, Žaloudík J (2003) Doporučené zásady péče o nemocné s nádory prsu a vaječníků a zdravé osoby se zárodečnými mutacemi genů BRCA1 nebo BRCA2 [Recommendations for care of patients with breast and ovarian cancer and healthy individuals with germline mutations in BRCA1 or BRCA2 gene]. Klin Onkol 16:28–34

25. Plevová P, Novotný J, Petráková K, Palácová M, Kalábová R, Schneiderová M, Foretová L (2009) Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií [Hereditary breast and ovarian cancer syndrome]. Klin Onkol 22(Suppl):S8–11
26. Pohlreich P, Stribrna J, Kleibl Z, Zikan M, Kalbacova R, Petruzelka L, Konopasek B (2003) Mutations of the BRCA1 gene in hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic. Med Princ Pract 12:23–29
27. Pohlreich P, Zikan M, Stribrna J, Kleibl Z, Janatova M, Kotlas J, Zidovska J, Novotny J, Petruzelka L, Szabo C, Matous B (2005) High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. Breast Cancer Res 7:R728–R736
28. Parmigiani G, Berry D, Aguilar O (1998) Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. Am J Hum Genet 62:145–158
29. Workman C, Jensen LJ, Jarmer H, Berka R, Gautier L, Nielser HB, Saxild HH, Nielsen C, Brunak S, Knudsen S (2002) A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. Genome Biol 3: research0048.1–16
30. Olshen AB, Venkatraman ES, Lucito R, Wigler M (2004) Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. Biostatistics 5:557–572
31. den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. Hum Mutat 15:7–12
32. International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 431:931–945
33. Soukupova J, Dundr P, Kleibl Z, Pohlreich P (2008) Contribution of mutations in ATM to breast cancer development in the Czech population. Oncol Rep 19:1505–1510
34. Montagna M, Dalla PM, Menin C, Agata S, De Nicolo A, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E (2003) Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. Hum Mol Genet 12:1055–1061
35. Hartmann C, John AL, Klaes R, Hofmann W, Bielen R, Koehler R, Janssen B, Bartram CR, Arnold N, Zschocke J (2004) Large BRCA1 gene deletions are found in 3% of German high-risk breast cancer families. Hum Mutat 24:534
36. Lindor NM, Lindor RA, Apicella C, Dowty JG, Ashley A, Hunt K, Mincey BA, Wilson M, Smith MC, Hopper JL (2007) Predicting BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers: comparison of LAMBDA, BRCAPRO, Myriad II, and modified Couch models. Fam Cancer 6:473–482
37. Antoniou AC, Hardy R, Walker L, Evans DG, Shenton A, Eeles R, Shanley S, Pichert G, Izatt L, Rose S, Douglas F, Eccles D, Morrison PJ, Scott J, Zimmern RL, Easton DF, Pharoah PD (2008) Predicting the likelihood of carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation: validation of BOADICEA, BRCAPRO, IBIS, Myriad and the Manchester scoring system using data from UK genetics clinics. J Med Genet 45:425–431
38. van Harssel JJ, van Roozendaal CE, Detisch Y, Brandão RD, Paulussen AD, Zeegers M, Blok MJ, Gómez García EB (2009) Efficiency of BRCAPRO and Myriad II mutation probability thresholds versus cancer history criteria alone for BRCA1/2 mutation detection. Fam Cancer. doi 10.1007/s10689-009-9305-1
39. Narod SA, Foulkes WD (2004) BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. Nat Rev Cancer 4:665–676
40. Breast Cancer information Core database (BIC). http://resarch.nhgri.nih.gov/BIC. Accessed 26 Nov 2009
41. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, Roach KC, Mandell J, Lee MK, Ciernikova S, Foretova L, Soucek P, King MC (2006) Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. JAMA 295:1379–1388
42. Casilli F, Tournier I, Sinilnikova OM, Coulet F, Soubrier F, Houdayer C, Hardouin A, Berthet P, Sobol H, Bourdon V, Muller D, Fricker JP, Capoulade-Metay C, Chompret A, Nogues C, Mazoyer S, Chappuis P, Maillet P, Philippe C, Lortholary A, Gesta P, Bezieau S, Toulas C, Gladieff L, Maugard CM, Provencher DM, Dugast C, Delvincourt C, Nguyen TD, Faivre L, Bonadona V, Frebourg T, Lidereau R, Stoppa-Lyonnet D, Tosi M (2006) The contribution of germline rearrangements to the spectrum of BRCA2 mutations. J Med Genet 43:e49

PŘÍLOHA 2

Ticha I, Kleiblova P, Fidlerova J, Novotny J, Pohlreich P, Kleibl Z

Lack of large intragenic rearrangements in dihydropyrimidine dehydrogenase (*DPYD*) gene in fluoropyrimidine-treated patients with high-grade toxicity.

Cancer Chemother Pharmacol. (2009) 64(3):615-8. (**IF_{2008} = 2.740**)

Cancer Chemother Pharmacol
DOI 10.1007/s00280-009-0970-4

SHORT COMMUNICATION

Lack of large intragenic rearrangements in dihydropyrimidine dehydrogenase (*DPYD*) gene in fluoropyrimidine-treated patients with high-grade toxicity

Ivana Ticha · Petra Kleiblova · Julie Fidlerova · Jan Novotny · Petr Pohlreich · Zdenek Kleibl

Received: 4 February 2009 / Accepted: 20 February 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract
Purpose Deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) has been associated with severe fluoropyrimidines (FP) toxicity. Mutations in DPD-coding gene (*DPYD*) were shown to increase the risk of severe toxicity in FP-treated cancer patients. However, the majority of *DPYD* alterations characterized in these patients has been considered as polymorphisms and known deleterious mutations are rare and present in only limited subgroup of patients with high toxicity. Recently, the common fragile site FRA1E was mapped within *DPYD* locus but intragenic rearrangements in *DPYD* gene were not studied so far.
Methods We performed the analysis of intragenic rearrangements of *DPYD* using multiplex ligation-dependent probe amplification in 68 patients with high-grade gastrointestinal and/or hematological toxicity developed at the beginning of FP treatment.
Results We did not detect any deletion/duplication of one or more *DPYD* exons in analyzed patients.
Conclusions We assume that rearrangements in *DPYD* gene play insignificant role in the development of serious FP-related toxicity.

Keywords Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) · Dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) · 5-Fluorouracil · Fluoropyrimidines · Toxicity · Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Introduction

5-Fluorouracil (5-FU) and its prodrugs (e.g. capecitabine) belong to the most often used chemotherapeutics for the systemic treatment of a broad spectrum of solid tumors. 5-FU exerts cytotoxic effects on rapidly proliferating cells because of its inhibition of thymidylate synthase and interference with RNA and DNA metabolism [1]. Over 80% of administered 5-FU is rapidly inactivated in fluoropyrimidines catabolic pathway involving dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), the introductory and rate limiting enzyme of fluoropyrimidine degradation. It was shown that the inhibition of DPD activity causes life-threatening toxicity and mutations in this enzyme are now accepted to predispose to development of fluoropyrimidine toxicity in their carriers [2]. During past decade over 50 alterations in the *DPYD* gene were characterized; however, majority of them represent missense or intronic variants with unknown biological importance and clinical significance [3, 4]. Only a limited number of patients carry nonsense or frameshift mutations (including the most prevalent IVS14 + 1G > A mutation) significantly affecting DPD catalytic activity [5, 6]. The *DPYD* gene spans nearly 900 kilobases (kb) region on chromosome 1p22 [7]. Recently, Hormozian et al. [8] characterized the common fragile site FRA1E mapped to the 370 kb region within the *DPYD* gene and raised the question whether presence of FRA1E could contribute to *DPYD* genomic rearrangements in patients suffering from 5-FU toxicity. During the last few years, multiplex

I. Ticha, P. Kleiblova contributed equally to this work.

I. Ticha · P. Kleiblova · J. Fidlerova · P. Pohlreich · Z. Kleibl (✉)
Institute of Biochemistry and Experimental Oncology,
1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague,
U Nemocnice 5, 128 53 Prague 2, Czech Republic
e-mail: zdekleje@lf1.cuni.cz

J. Fidlerova · J. Novotny
Department of Oncology,
1st Faculty of Medicine and General Teaching Hospital,
Charles University in Prague, U Nemocnice 2,
128 53 Prague, Czech Republic

Published online: 14 March 2009

ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis has become widely used as a simple and reliable method for the detection of intragenic rearrangements [9].

In this report, we present the results of MLPA analysis of the *DPYD* gene in the set of 68 cancer patients with serious or life-threatening fluoropyrimidine-related toxicity.

Materials and methods

Patients and samples

The test group included 68 patients with serious (grade 3–4) hematological (leukopenia, neutropenia or thrombocytopenia) and/or gastrointestinal (mucositis, emesis, diarrhea) toxicity classified according to the National Cancer Institute (NCI) Common Toxicity Criteria (CTC) scale 3.0 (Table 1). All patients were recruited between January 2002 and May 2008 from regional oncology centers in the Czech Republic under the supervision of Comprehensive Oncology Center of the General Teaching Hospital in Prague. Inclusion criteria for enrollment of patients into the study involved development of serious gastrointestinal and/or hematological toxicity during the first or the second cycle of fluoropyrimidine-based chemotherapy. Four patients, three with combined and one with isolated gastrointestinal toxicity, died of fatal complications attributable to the fluoropyrimidine-based chemotherapy. All samples analyzed in this study were previously genotyped for the presence of *DPYD* coding sequence variants and IVS14+1G > A (Table 1) [10]. None *DPYD* sequence variant was found in 13 out of 68 patients (19.1%) suffering from high-grade toxicity. Three negative controls were prepared by pooling of 20 DNA samples of anonymized non-cancer individuals. All patients and controls were Caucasians of the Czech origin. Signed written informed consent approved by the ethics committee of the General Teaching Hospital in Prague was obtained from all study participants.

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples of patients and controls using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). One hundred nanograms of DNA were used for MLPA analysis performed with SALSA MLPA P103 DPYD kit (MRC-Holland) under conditions specified by manufacturer [11]. Amplified PCR products were separated in the 36 cm capillary filled with POP-7 polymer on an ABI PRISM 3130 analyzer (Applied Biosystems). The collected data were analyzed using Gene Mapper 4.0 software (Applied Biosystems). The MLPA

Table 1 Basic clinical characteristics of analyzed patients treated by 5-fluorouracil (5-FU) or capecitabine-based chemotherapeutic regimes

Patients with toxicity (toxicity grade 3–4) *N* = 68	
Demographic parameters	
Females *N* (%)	36 (52.9)
Mean age (years ± SD)	60.9 ± 10.5
Age range (years)	30–75
Males, *N* (%)	32 (47.1)
Mean age (years ± SD)	63.2 ± 7.2
Age range (years)	47–73
Cancer diagnose *N* (%)	
Esophageal cancer	2 (2.9)
Gastric cancer	4 (5.9)
Colorectal cancer	48 (70.6)
Biliary cancer	2 (2.9)
Pancreatic cancer	1 (1.5)
Laryngeal cancer	1 (1.5)
Breast cancer	10 (14.7)
Chemotherapy regimens *N* (%)	
Bolus 5-FU	17 (25.0)
Continuous 5-FU	29 (42.6)
Capecitabine	7 (10.3)
FOLFIRI	1 (1.5)
FOLFOX	12 (17.7)
Other	2 (2.9)
Toxicity grade 3–4 according to NCIC CTC *N* (%)	
Overall gastrointestinal only	35 (51.5)
Overall hematological only	9 (13.2)
Overall gastrointestinal and hematological	24 (35.3)
Mucositis	23 (33.4)
Emesis	13 (19.1)
Diarrhea	37 (54.4)
Leucopenia	10 (14.7)
Neutropenia	32 (47.1)
Thrombocytopenia	12 (17.7)
DPYD alterations[a]	
c.85T > C (C29R)	24 (35.3)
c.496A > G (M166 V)	19 (27.9)
c.775 A > G (K259E)	1 (1.5)
c.1050 G > A (R357H)	1 (1.5)
c.1236 G > A (E412E)	2 (2.9)
c.1601G > A (S534 N)	4 (5.9)
c.1627A > G (I543 V)	18 (26.5)
c.1896T > C (F632F)	3 (4.4)
IVS14 + 1G > A (e14 del)	5 (7.4)
c.2194G > A (V732I)	10 (14.7)

[a] Results of mutation analysis of *DPYD* gene performed in all patients analyzed in this study were published previously [10]

chromatograms were evaluated by both visual examination of peak profiles and quantitative comparison of peak areas. Visual examination of peak profiles with representative control samples was performed by three independent researchers in a blinded manner. Samples with discordant results (i.e. result reported as "uncertain" at least by one reviewer) were reanalyzed by the same procedure. The quantitative comparison of peak areas was performed from data exported from Gene Mapper to spread sheet calculator. The individual peak area was normalized to sum of that in particular sample MLPA analysis. As a significant for gain or loss of genetic material in heterozygotes, a 35–50% decrease or increase of relative peak area of the amplification product in comparison with averaged normalized signals of control samples was considered.

Results

To evaluate the prevalence of *DPYD* genomic rearrangements in fluoropyrimidine-treated patients, we screened a series of 68 unrelated cancer patients by MLPA analysis. We did not find a deletion/duplication of one or more *DPYD* exons in any of these high-grade toxicity patients. Particularly, no differences were found in signal intensities of 15 probes covering the whole FRA1E site (exon 9–18) and seven probes located in maximum breakage region (exons 13–16). The MLPA analysis clearly recognized all five previously characterized heterozygotes carrying the c.1905 + 1G > A (IVS14 + 1G > A) mutation resulting in exon 14 skipping (Fig. 1). We did not notice any influence of previously characterized *DPYD* coding sequence alterations in these patients on results of MLPA analysis (Table 1).

Discussion

Similar to other cytotoxic drugs, fluoropyrimidines have a narrow therapeutic index combined with high interpatient pharmacokinetic variability resulting in severe toxicity development that negatively affects the therapeutic outcome [12]. Pharmacological interconversion of fluoropyrimidines is dependent on DPD activity introducing their catabolism. Genetic variants of the *DPYD* gene resulting in the synthesis of protein with reduced DPD activity thereby influence 5-FU pharmacokinetics and toxicity profile [13]. Numerous studies proved that DPD deficiency leads to severe toxicity with 5-FU and capecitabine exposure. Identification of patients at risk of serious and life-threatening toxicity development become an important challenge for therapy individualization in clinical oncology. Different laboratory approaches used for prediction of fluoropyrimidine-related toxicity based on *DPYD* genotyping, quantification of its expression, measurement of DPD enzymatic activity or determination of overall (fluoro)pyrimidine catabolic pathway capacity were introduced and have been applied in clinical settings [14, 15].

Previously reported mutation analyses performed in individual cases and small groups of patients considered that IVS14 + 1G > A (*DPYD**2A allele) has been the most significant *DPYD* mutation [16, 17]; however, recent larger studies have shown that early reports overestimated frequency of IVS14 + 1G > A and that this alteration is responsible for about 6% of high-grade toxicity cases [5, 18]. Contradictory results were published about the significance of frequent missense variants in association with fluoropyrimidine-related toxicity [3, 19]. The presence of large intragenic alterations in *DPYD* gene was not analyzed

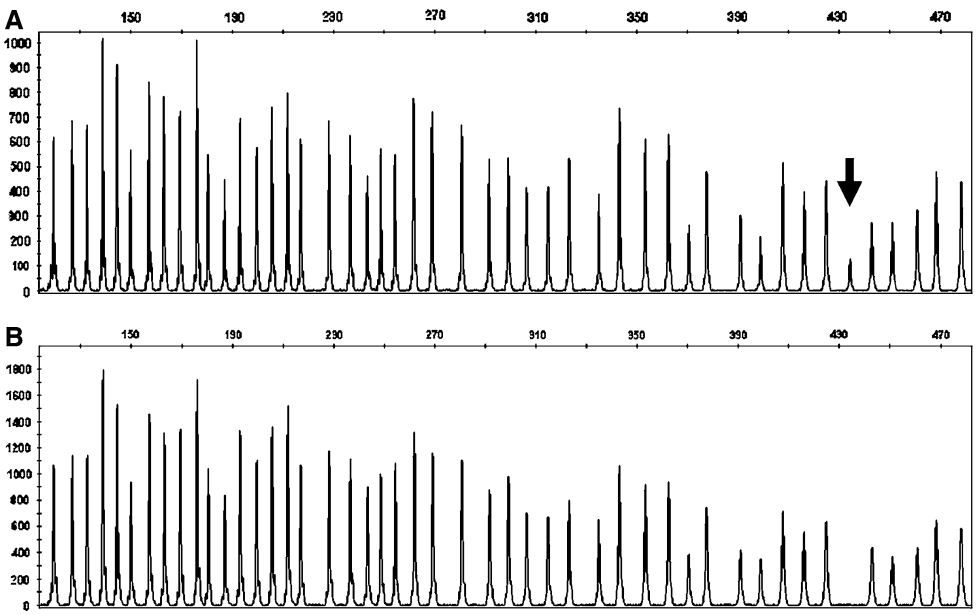


Fig. 1 Typical results of *DPYD* MLPA analysis. The MLPA probes cover all of the 23 *DPYD* exons, 12 exons were covered by two probes and three probes were present for exon 1. Single probe served for recognition of the IVS14 + 1G > A mutation (**a** peak signal in heterozygotic carrier marked by *black arrow*) absent in sample without mutation (**b**)

so far, moreover, recent characterization of common fragile site FRA1E mapped to the 370 kb region of the *DPYD* gene between introns 8 and 18 with the region of maximum breakage spanning 185 kb of genomic sequence between introns 12 and 16 had further emerged its possibility [8]. Lack of rearrangements in *DPYD* gene tested from DNA samples isolated from peripheral blood in our set of patients suffering from high fluoropyrimidine-related toxicity indicates that these inherited intragenic changes unlikely contribute to this pharmacogenomic syndrome. On the other hand, presence of FRA1E within *DPYD* sequence may raise the question of whether increased frequency of the *DPYD* gene disruption could be found in cancer cells acquiring impaired DNA repair capacity? As low DPD level is believed to be advantageous for the tumor response, patients with somatic *DPYD* intragenic rearrangements in tumor tissue could benefit from fluoropyrimidine-based therapy in terms of its efficacy [20].

Conclusion

Steadily increasing number of patients with cancer worldwide including those treated by fluoropyrimidine-based chemotherapy call for methods enabling reliable individual prediction of treatment-related toxicity. Numerous methods have been used for this prediction including combinatorial strategies implementing both genotypic and phenotypic approaches. Our findings show that large *DPYD* intragenic rearrangements were absent in 68 high toxicity patients who represent the subpopulation with a highest probability of their occurrence. This negative result indicates that the large genomic rearrangements in *DPYD* gene play insignificant role in the development of serious toxicity. Although the result of our study need to be further validated in other populations, we assume that the contribution of intragenic *DPYD* rearrangements to fluoropyrimidines toxicity development is infrequent and, therefore, the MLPA analysis of *DPYD* gene has little clinical relevance and could be omitted in *DPYD* genotyping.

Acknowledgments This study was supported by the grant of Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic No. 1A8708-4/2005 and the Research Project of The Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic No. MSM0021620808.

References

1. van Kuilenburg AB (2004) Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. Eur J Cancer 40:939–950
2. Diasio RB (1998) Sorivudine and 5-fluorouracil; a clinically significant drug-drug interaction due to inhibition of dihydropyrimidine dehydrogenase. Br J Clin Pharmacol 46:1–4
3. Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G et al (2000) Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. Pharmacogenetics 10:217–223
4. Maekawa K, Saeki M, Saito Y et al (2007) Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences. J Hum Genet 52:804–819
5. Schwab M, Zanger UM, Marx C et al (2008) Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU toxicity study group. J Clin Oncol 26:2131–2138
6. Bosch TM, Bakker R, Schellens JH et al (2007) Rapid detection of the DPYD IVS14 + 1G > A mutation for screening patients to prevent fluorouracil-related toxicity. Mol Diagn Ther 11:105–108
7. Johnson MR, Wang K, Tillmanns S et al (1997) Structural organization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. Cancer Res 57:1660–1663
8. Hormozian F, Schmitt JG, Sagulenko E et al (2007) FRA1E common fragile site breaks map within a 370kilobase pair region and disrupt the dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD). Cancer Lett 246:82–91
9. den Dunnen JT, White SJ (2006) MLPA and MAPH: sensitive detection of deletions and duplications. In: Ujhazy V (ed) Current protocols in human genetics, Wiley, New York, pp 7.14.1–7.14.20
10. Kleibl Z, Fidlerova J, Kleiblova P et al (2009) Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy. Neoplasma 56 (accepted)
11. MRC-Holland. http://www.mlpa.com/, SALSA MLPA kit P103 DPYD
12. Ploylearmsaeng SA, Fuhr U, Jetter A (2006) How may anticancer chemotherapy with fluorouracil be individualised? Clin Pharmacokinet 45:567–592
13. Maring JG, van Kuilenburg AB, Haasjes J et al (2002) Reduced 5-FU clearance in a patient with low DPD activity due to heterozygosity for a mutant allele of the DPYD gene. Br J Cancer 86:1028–1033
14. Ezzeldin HH, Diasio RB (2008) Predicting fluorouracil toxicity: can we finally do it? J Clin Oncol 26:2080–2082
15. Mercier C, Ciccolini J (2006) Profiling dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in patients with cancer undergoing 5-fluorouracil/capecitabine therapy. Clin Colorectal Cancer 6:288–296
16. Saif MW, Ezzeldin H, Vance K et al (2007) DPYD*2A mutation: the most common mutation associated with DPD deficiency. Cancer Chemother Pharmacol 60:503–507
17. van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zoetekouw L et al (2002) High prevalence of the IVS14 + 1G > A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene of patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity. Pharmacogenetics 12:555–558
18. Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L et al (2006) Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. Mol Cancer Ther 5:2895–2904
19. Gross E, Busse B, Riemenschneider M et al (2008) Strong association of a common dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism with fluoropyrimidine-related toxicity in cancer patients. PLoS ONE 3:e4003
20. Imyanitov EN, Moiseyenko VM (2007) Molecular-based choice of cancer therapy: realities and expectations. Clin Chim Acta 379:1–13

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta

Kateřinská 32, Praha 2

Prohlášení zájemce o nahlédnutí do závěrečné práce absolventa studijního programu uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	**Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)**	**Signatura závěrečné práce**	**Datum**	**Podpis**