

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Doktorské studijní programy v biomedicině
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



MUDr. Martin Matějů

KLINICKO-GENETICKÉ ASPEKTY FAMILIÁRNÍHO VÝSKYTU KARCINOMU PRSU

FREKVENCE REKURENTNÍCH MUTACÍ V GENECH *BRCA1* A *BRCA2*
V ČESKÉ REPUBLICĚ A ÚLOHA GENU *NBN*

CLINICAL AND GENETIC ASPECTS OF FAMILIAL BREAST CANCER

FREQUENCY OF RECURRENT MUTATIONS IN *BRCA1* AND *BRCA2* GENES
IN CZECH REPUBLIC AND THE ROLE OF *NBN* GENE

Dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D.
Onkologická klinika 1.LF UK a VFN v Praze

Školitel specialista: Doc. MUDr. Petr Pohlreich, CSc.
Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK v Praze

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze své práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 14. 6. 2014

Martin Matějů

Identifikační záznam:

Matějů, Martin. Klinicko-genetické aspekty familiárního výskytu karcinomu prsu. Frekvence rekurentních mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* v České republice a úloha genu *NBN*. [Clinical and Genetic Aspects of Familial Breast Cancer. Frequency of Recurrent Mutations in *BRCA1* and *BRCA2* Genes in Czech republic and the role of *NBN* Gene]. Praha, 2014. 94 s., 3 příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Onkologická klinika. Vedoucí práce: Doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D.

Abstrakt

Úvod: Nejvýznamnějšími geny spojovanými s hereditárním karcinomem prsu a ovarií jsou *BRCA1/2* a vliv na zvýšení rizika se předpokládá též u *NBN*. Cílem této práce je stanovit frekvenci rekurentních mutací *BRCA1/2* v neselektovaném souboru pacientek s karcinomem prsu a frekvenci nejčastějších patogenních mutací *NBN* v ČR, zhodnotit efektivnost indikačních kritérií ke genetickému vyšetření a zvážit rozšíření spektra testovaných genů o *NBN*. **Metody:** K analýze rekurentních mutací 5382insC a 300T>G v *BRCA1* bylo užito RFLP, exon 11 téhož genu byl analyzován pomocí PTT, vybraný úsek 11. exonu *BRCA2* pomocí DHPLC a 6. exon *NBN* pomocí HRMA. Všechny zachycené mutace byly potvrzeny sekvenováním. **Výsledky:** V souboru 679 neselektovaných pacientek s karcinomem prsu bylo v *BRCA1* zachyceno 7 mutací 5382insC, 3 mutace 300T>G a další 4 jiné mutace. V *BRCA2* byly identifikovány dvě lokálně prevalentní mutace. U 730 kontrol byla zachycena pouze jedna mutace, a to 5382insC v *BRCA1*. Ve sledovaném úseku exonu 6 genu *NBN* bylo v souboru 600 vysokorizikových pacientů zachyceno celkem 5 mutací, z toho dvě 657del5 a jedna R215W; v souboru 703 neselektovaných pacientek s karcinomem prsu bylo identifikováno celkem 8 mutací, z toho dvě 657del5 a tři R215W; v souboru 915 kontrol pak bylo detekováno celkem 9 mutací, z toho dvě 657del5 a čtyři R215W. **Závěr:** Frekvence mutací v genech *BRCA1/2* byla ve sledovaném souboru 2,4%. Současná indikační kritéria by zachytila jen 6 ze 16 nosiček. Vyšetřování populačně specifických mutací u všech pacientek s karcinomem prsu by zachytilo více nosičů před chirurgickým výkonem, což je pro volbu terapie klíčové. Frekvence sledovaných mutací v genu *NBN* je v ČR nízká a mezi soubory se výrazně nelišila. Rutinní vyšetřování mutací v genu *NBN* tak v ČR nelze doporučit.

Klíčová slova: karcinom prsu, *BRCA1*, *BRCA2*, *NBN*, *NBS1*, ČR, český, HBOC, frekvence, mutace, hereditární, familiární, neselektovaný, populace, sporadický

Summary:

Background: An increased risk for development of hereditary breast cancer is associated with germline mutations in *BRCA1/2* and the influence of *NBN* mutations is also supposed. The aim of this study is to specify the frequency of recurrent mutations in *BRCA1/2* in unselected breast cancer patients and the frequency of most common pathogenic mutations in *NBN* in Czech republic, to assess current criteria for genetic testing and to consider the addition of *NBN* to the tested genes. **Methods:** Screening for recurrent mutations 5382insC and 300T>G in *BRCA1* was performed by RFLP, screening for mutations in exon 11 of *BRCA1* was performed by PTT, screening for mutations in a selected region of exon 11 of *BRCA2* by DHPLC, and screening for mutations in exon 6 of *NBN* by HRMA. All the mutations were confirmed by direct sequencing. **Results:** In 679 unselected breast cancer patients 7 carriers of 5382insC, 3 of 300T>G, and 4 of other mutations in *BRCA1* were identified. 2 locally prevalent mutations were found in *BRCA2*. In 730 controls only one 5382insC *BRCA1* mutation was identified. Out of 5 *NBN* mutations found in 600 high-risk patients two were 657del5 and one R215W. A total of 8 *NBN* mutation carriers were identified among 703 breast cancer patients, 2 of them 657del5 carriers and three R215W carriers. In 915 controls 9 *NBN* mutations were detected, of which two 657del5 and four R215W. **Conclusion:** *BRCA1/2* mutation frequency of 2,4% was observed in our series of unselected breast cancer patients. 10 of 16 *BRCA1/2* patients would not meet any of currently used criteria for genetic testing. Screening of all breast cancer patients might detect more carriers prior to surgery and thus improve the decision making regarding therapy. *NBN* mutation frequency is very low in Czech republic and did not differ significantly among all three studied groups. Routine screening for *NBN* mutations in Czech unselected breast cancer population cannot be recommended.

Key words: breast cancer, *BRCA1*, *BRCA2*, *NBN*, *NBS1*, Czech, HBOC, frequency, mutation, hereditary, familial, unselected, population, population-based

OBSAH	1
I. ÚVOD	4
1. Karcinom prsu	4
1.1. Fyziologie prsu	4
1.2. Nádory prsu	4
1.2.1. Histopatologická klasifikace nádorů prsu.....	4
1.2.1.1. Karcinomy <i>in situ</i>	5
1.2.1.2. Invazivní karcinomy.....	5
1.2.2. Grading a imunohistochemické vyšetření karcinomu prsu	6
1.2.3. Klasifikace podle profilů genové exprese	7
1.2.4. Epidemiologie karcinomu prsu	8
1.2.4.1. Incidence a mortalita v ČR	8
1.2.5. Etiopatogeneze	10
1.2.5.1. Etiologie a rizikové faktory vzniku karcinomu prsu	10
1.2.5.2. Patogeneze a molekulární podstata vzniku karcinomu prsu	11
1.2.6. Příznaky	12
1.2.7. Diagnostika a screening	13
1.2.8. Prognostické faktory	14
1.2.9. Léčba karcinomu prsu	15
2. Geny spojené s vyšším rizikem vzniku karcinomu prsu a ovárií	16
2.1. Geny s vysokou penetrancí	17
2.1.1. <i>BRCA 1</i>	17
2.1.1.1. Struktura genu	17
2.1.1.2. Struktura a funkce proteinového produktu	18
2.1.2. <i>BRCA 2</i>	21
2.1.2.1.Struktura a funkce proteinového produktu	21
2.1.3. Gen <i>TP53</i> a jeho proteinový produkt	22
2.2. Geny se střední a nízkou penetrancí	23
2.2.1. Gen <i>CHEK 2</i> a funkce jeho proteinového produktu	23
2.2.2. Gen <i>ATM</i> a funkce jeho proteinového produktu	23
2.2.3. Gen <i>NBN</i>	24
2.2.3.1. Struktura a funkce proteinového produktu	24
2.2.3.2. NBS syndrom	25

3. Zárudečné mutace v predispozičních genech	26
3.1. Zárudečné mutace v hlavních predispozičních genech <i>BRCA1/2</i>	27
3.1.1. Riziko vzniku karcinomu prsu a ovárií u nosičů mutace v genech <i>BRCA1</i> a <i>BRCA2</i>	31
3.1.2. Klinické a histopatologické charakteristiky karcinomů prsu u pacientů s mutací v genu <i>BRCA1/2</i>	32
3.2. Zárudečné mutace v ostatních predispozičních genech	33
3.2.1. <i>NBN</i>	34
3.3. Polygenní riziko vzniku karcinomu prsu	35
4. Klinické aspekty	36
4.1. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovárií	37
4.2. Genetické poradenství a genetické vyšetření	38
4.2.1. Indikační kritéria ke genetickému vyšetření v genech <i>BRCA1</i> a <i>BRCA2</i>	40
4.2.2. Klinické aspekty genetického testování	41
4.2.2.1. Klinické aspekty genetického poradenství u zdravých nosiček mutace v genech <i>BRCA1/2</i>	42
4.2.2.2. Klinické aspekty genetického poradenství u pacientů s mutací v genech <i>BRCA1/2</i>	43
4.2.3. Etické aspekty genetického poradenství	44
4.2.4. Preventivní onkologická ambulance VFN	44
II. PRACOVNÍ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	46
III. MATERIÁL A METODY	47
1. Pacienti	47
1.1. Soubor pacientů testovaných na mutace v <i>BRCA 1/2</i>	47
1.2. Soubor pacientů testovaných na mutace v genu <i>NBN</i>	47
2. Izolace genetického materiálu	48
2.1. Izolace DNA z periferní krve	48
2.2. Kontrola koncentrace izolovaného genetického materiálu	48
2.3. Design primérů	49
3. Testování rekurentních mutací v genech <i>BRCA 1</i> a <i>BRCA2</i>	49
3.1. Prescreening rekurentních mutací v genu <i>BRCA1</i>	49
3.1.1. Prescreening rekurentní mutace c.5385insC	49
3.1.2. Prescreening rekurentní mutace c.300T>G	50

3.1.3. Prescreening mutací v exonu 11	51
3.2. Prescreening rekurentních mutací v genu <i>BRCA 2</i>	53
4. Prescreening mutací v genu <i>NBN</i>	54
5. Potvrzení a charakterizace nalezených mutací přímým sekvenováním	55
6. Statistické zpracování	57
IV. VÝSLEDKY	58
1. Specifika vyšetřované skupiny	58
1.1. <i>BRCA 1</i> a <i>BRCA 2</i>	58
1.2. <i>NBN</i>	58
2. Zachycené rekurentní mutace	59
2.1. <i>BRCA 1</i> a <i>BRCA 2</i>	59
2.2. <i>NBN</i>	61
3. Klinická a histopatologická charakteristika pacientek s mutací v genech <i>BRCA 1/2</i>	61
4. Klinická a histopatologická charakteristika pacientek s mutací v genu <i>NBN</i>	63
5. Databáze pacientek s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovaria	64
V. DISKUZE	65
1. <i>BRCA 1/2</i>	65
2. <i>NBN</i>	69
VI. ZÁVĚR	74
PODĚKOVÁNÍ	76
SEZNAM ZKRATEK	77
SEZNAM OBRÁZKŮ	81
SEZNAM TABULEK	82
POUŽITÁ LITERATURA.....	83
SEZNAM PŘÍLOH	95

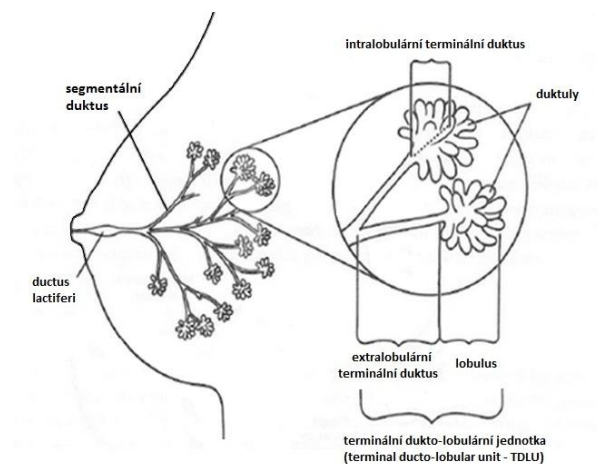
I. ÚVOD

1. Karcinom prsu

Karcinom prsu je maligní nádorové onemocnění vycházející z tkání prsu. Postihuje především ženy. V České republice stejně jako ve většině vyspělých zemí světa [1] patří vedle zhoubných novotvarů kůže k nejčastějším nádorovým onemocněním u žen[2]. Karcinom prsu představuje společensky významné onemocnění, a to jak vzhledem k vysoké incidenci a mortalitě, tak vzhledem k vysokým nákladům na diagnostiku i léčbu.

1.1. Fyziologie prsu

Prs je párový orgán, který je u žen tvořen kůží, mléčnou žlázou a tukovým vazivem. Mléčná žláza se skládá z epitelových a stromálních buněk. Epitel vytváří strukturu větvících se mlékovodů (duktů), které se spojují ve strukturální a funkční jednotku mléčné žlázy – lalůček (lobulus). Terminální duktolobulární jednotka („terminal ducto-lobular unit“, TDLU, obrázek č.1) tvoří základní stavební složku žlázového tělesa prsu. Hlavní mlékovody vyústí v bradavce. Stroma je složeno z tukové a fibrózní tkáně a představuje většinu objemu nelaktujícího prsu. Struktura TDLU a poměr zastoupení stromální a epitelové komponenty se mění v průběhu menstruačního cyklu, těhotenství, laktace a v menopauze.[3]



Obrázek 1: Anatomie prsu, upraveno podle [4]

1.2. Nádory prsu

1.2.1. Histopatologická klasifikace nádorů prsu

Nejčastějšími zhoubnými novotvary prsu jsou nádory epitelového původu – epiteliální maligní nádory prsu (primární karcinomy prsu). Neepitelové varianty zhoubných nádorů prsu

(nejčastěji maligní mezenchymální tumory) jsou velmi vzácné.[5] Primární karcinomy prsu se z klinicko-patologického hlediska dělí na neinvazivní (karcinomy *in situ*) a invazivní karcinomy.

1.2.1.1. Karcinomy *in situ*

Pro karcinomy *in situ* je charakteristická přítomnost maligních epiteliálních buněk, které nemají schopnost invadovat skrze bazální membránu a vytvářet metastatická ložiska. Podle histopatologické klasifikace se rozlišují karcinomy duktální a lobulární. Duktální karcinom *in situ* (DCIS) tvoří asi 80 % všech neinvazivních forem karcinomu a 3-4 % symptomatických karcinomů a zároveň představuje 17 % všech karcinomů zachycených screeningovou mammografií. DCIS lze dále rozdělit do několika subtypů podle převažujícího charakteru růstu nádorových buněk (komedo, papilární atd.). Ve většině případů se v histologickém nálezu prolíná více strukturálních forem. Lobulární karcinom *in situ* (LCIS) zahrnuje asi 20 % neinvazivních karcinomů, což odpovídá přibližně 0,5 % symptomatických karcinomů. Během screeningu je LCIS detekován jen asi v 1 % případů.[6]

Podle v současnosti přijímaného konsenzu představují karcinomy *in situ* mezičlánek mezi normální tkání prsu a invazivním karcinomem. Navíc v sobě mohou skrývat okrsky invazivního karcinomu, který nebyl zachycen bioptickým vyšetřením. DCIS přechází do invazivní formy onemocnění asi v 70 %, zatímco LCIS jen asi v 35 %. LCIS bývá často multifokální a multicentrický a v až 15 % případů se vyvíjí karcinom v kontralaterálním prsu.[6]

1.2.1.2. Invazivní karcinomy

Primární invazivní karcinomy prsu jsou charakterizovány šířením maligních epiteliálních buněk do okolí a schopností vytvářet vzdálená metastatická ložiska v jiných orgánech. Aktuální klasifikace WHO[5] rozlišuje duktální invazivní karcinom (nejčastějším subtypem je NOS – „not otherwise specified“), lobulární invazivní karcinom (subtypy klasický, smíšený, alveolární atd.) a několik dalších histopatologických typů (tubulární, invazivní kribriformní, Pagetův karcinom – postihující bradavku, medulární atd.), jejichž četnost však v souhrnu nepřesahuje 5 % [3]. Z posledně jmenovaných je významný medulární karcinom, který je diagnostikován asi u 2-3 % všech karcinomů, nicméně mezi nosičkami mutace v genu *BRCA1* se vyskytuje v neproporciálně vyšším zastoupení (až 13 %)[7].

Duktální invazivní karcinomy, jež představují zhruba 70-80 % všech karcinomů prsu, inklinují spíše k solidnímu či invazivnímu růstu a vzhledem k masivní fibroprodukcí mívají tužší konzistenci.

Výrazně méně častý lobulární karcinom (5-10 %) se šíří typicky infiltrativním způsobem, což je způsobeno snížením exprese E-cadherinu, které má za následek ztrátu soudržnosti nádorových elementů a kromě volného šíření do okolních tkání prsní žlázy též časně metastazování i do pro karcinomy prsu neobvyklých lokalizací (meningy, GIT apod.).

Z klinického hlediska jsou biologické rozdíly mezi duktální a lobulární variantou invazivního karcinomu považovány za méně významné, než se dříve předpokládalo, a pokud je zvolena vhodná systémová léčba, nemají zásadnější vliv na prognózu onemocnění.[7], [8]

1.2.2. Grading a imunohistochemické vyšetření karcinomu prsu

Dalším z kritérií používaných při rozhodování o průběhu léčby je tzv. grading, který odpovídá stupni diferenciaci nádorové tkáně. V současnosti nejvíce užívaná tzv. nottinghamská klasifikace vychází z kvantifikace a skórování tří morfologických parametrů: tvorby tubulů, jaderné polymorfie a počtu mitóz. Výsledné skóre udává nádorový grade 1-3.[9]

V rámci standardního imunohistochemického vyšetření se u karcinomů prsu dále určuje exprese steroidních hormonálních receptorů (ER, PR, ev. AR), exprese receptoru c-ErbB-2 (HER2/neu) a hodnota proliferativního indexu Ki67.

Estrogeny mají v regulaci nádorového růstu u karcinomu prsu výsadní postavení, jejich aktivita je zprostředkována navázáním na specifický jaderný transkripční faktor – estrogenový receptor (ER). ER obsahuje několik domén. DNA vázající doména rozpoznává specifické oblasti promotorů cílových genů, tzv. estrogenové responzivní elementy (EREs), přítomny jsou též různé transaktivační domény a domény zprostředkující interakce mezi proteiny. Aktivaci ER je stimulována buněčná proliferace, a to mj. prostřednictvím aktivace růstových faktorů, stimulací exprese receptorů pro růstové faktory, aktivací proteolytických enzymů a onkogenů (např. *ErbB-2*, *ras*, *myc*) a inaktivací antionkogenů (p53, RB1, s100a4). Brzy po svém objevení se ER stal široce používaným prediktivním markerem odpovědi na hormonální terapii i důležitým prognostickým faktorem. [10] Naproti tomu absence exprese progesteronového receptoru (PR) představuje významný negativní prognostický faktor. [11]

Lidský receptor epidermálního růstového faktoru 2 (ErbB-2 či HER2/neu) je transmembránový receptor s tyrozinkinázovou aktivitou, jehož ligand zatím nebyl identifikován a u něhož se předpokládá, že heterodimerizací s dalšími receptory téže rodiny (ErbB-1, ErbB-3 a ErbB-4), které vážou epidermální růstový faktor (EGF) nebo heregulin, amplifikuje signály poskytované těmito receptory. Amplifikace genu c-ErbB-2 je detekována u přibližně 15-25 % karcinomů prsu a silně koreluje s overexpresí jeho proteinu. Amplifikace i overexprese tohoto genu sice

představují negativní prognostický faktor, ale zároveň predikují odpověď na anti-HER2/neu terapii transtuzumabem (Herceptin)[12], lapatinibem (Tyverb) či pertuzumabem (Perjeta)[13]. Ki67 je jaderný protein, exprimovaný v průběhu celého buněčného cyklu kromě G0 fáze. Jedná se o marker proliferační aktivity buněk. Ki67 se stanovuje imunohistochemicky pomocí protilátky MIB1. Poměr buněk vykazujících MIB1 pozitivitu k celkovému počtu hodnocených buněk se nazývá Ki67 index. Bývá vyjadřován v procentech. Vysoká mitotická aktivita nádoru je indikátorem nepříznivého biologického chování a je spojena s nutností radikálnější terapie.

1.2.3. Klasifikace podle profilů genové exprese

Vedle tradiční histopatologické a imunohistochemické klasifikace byly na základě analýzy genového i proteinového profilu nádorových buněk karcinomu prsu charakterizovány dvě navzájem zcela odlišné skupiny: Luminální karcinomy se odvozují spíše z luminálních buněk prsní tkáně charakteristických svou sekreční aktivitou a závislostí na regulaci steroidními hormony, zatímco bazální karcinomy se odvozují především z myeloepitelií, které nevykazují hormonální závislost.

Pro klinické použití umožnily tyto nové poznatky popsat 5 základních podtypů karcinomu prsu uvedených v tabulce č. 1: 1. karcinomy s luminální diferenciací A – Luminal A (ER/PR+,HER2/neu-)¹; 2. karcinomy s luminální diferenciací B – Luminal B (ER/PR+, HER2/neu+); 3. HER2/neu pozitivní (ER/PR-, HER2/neu+), 4. Basal like karcinomy (ER/PR-, HER2/neu-, EGFR+ a/nebo cytokeratin 5/6 pozitivní) a 5. Normal like karcinomy (ER/PR-, HER2/neu-, EGFR-, cytokeratin 5/6 negativní). Pro klinické účely se tyto podtypy aproximují pomocí zástupných parametrů (Ki67 a grade) na 5 skupin: 1. Luminal A, 2. Luminal B – HER2/neu pozitivní, 3. Luminal B – HER2/neu negativní, 4. neluminální HER2/neu pozitivní a 5. triple-negativní (ER-, PR-,HER2/neu-) [14] [15]

karcinomy s luminální diferenciací A	ER/PR+, HER2/neu-
karcinomy s luminální diferenciací B	ER/PR+, HER2/neu+
HER2/neu pozitivní karcinomy	ER/PR-, HER2/neu+
basal like karcinomy	ER/PR-, HER2/neu-, EGFR+ a/nebo cytokeratin 5/6 pozitivní
normal like karcinomy	ER/PR-, HER2/neu-, EGFR-, cytokeratin 5/6 negativní

Tabulka 1: Klasifikace typů karcinomu prsu podle profilů genové exprese

¹ Pozitivita ER a PR receptorů (znaménko +) začíná na hranici 5 % pozitivních jader nádorových buněk. Pozitivita HER2/neu odpovídá membránové pozitivitě 3+ (Hercep Test Dako) či 2+ (validováno *in situ* hybridizačním vyšetřením).

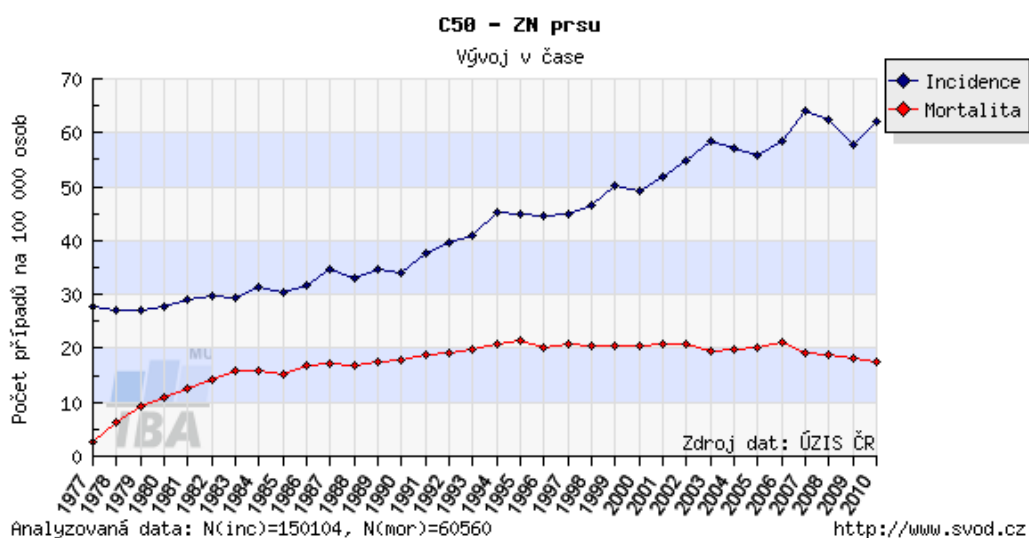
1.2.4. Epidemiologie karcinomu prsu

V České republice je stejně jako ve většině zemí severní a západní Evropy a Severní Ameriky dlouhodobě zaznamenávána vysoká incidence karcinomu prsu. [2],[16]

1.2.4.1. Incidence a mortalita v ČR

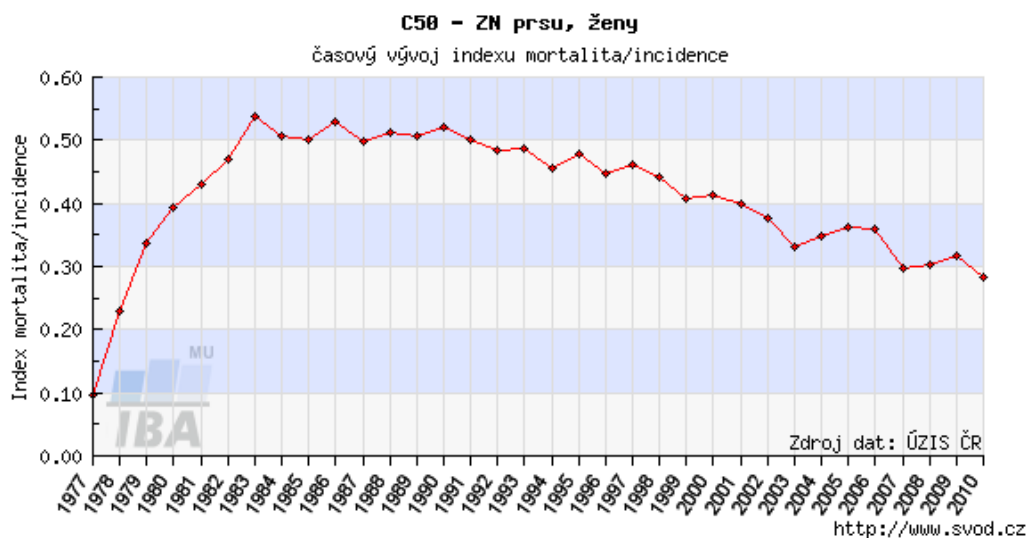
Podle údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR bylo v roce 2010 u žen v České republice diagnostikováno celkem 6498 nových případů zhoubného novotvaru prsu (ZN prsu, diagnóza C50), což představuje 8 % všech diagnostikovaných nádorových onemocnění a asi 16 % všech zhoubných novotvarů diagnostikovaných u žen. Karcinom prsu se s incidencí 121,3 případů na 100 000 osob řadí v ženské populaci na druhé místo po diagnóze C44 (jiný novotvar kůže).[17]

V roce 2010 dosáhla mortalita zhoubného novotvaru prsu v ženské populaci 34 případů na 100 000 osob, což znamená, že na tuto diagnózu zemřelo celkem 1837 žen, a jedná se tak o diagnózu s nejvyšší úmrtností žen u nás.



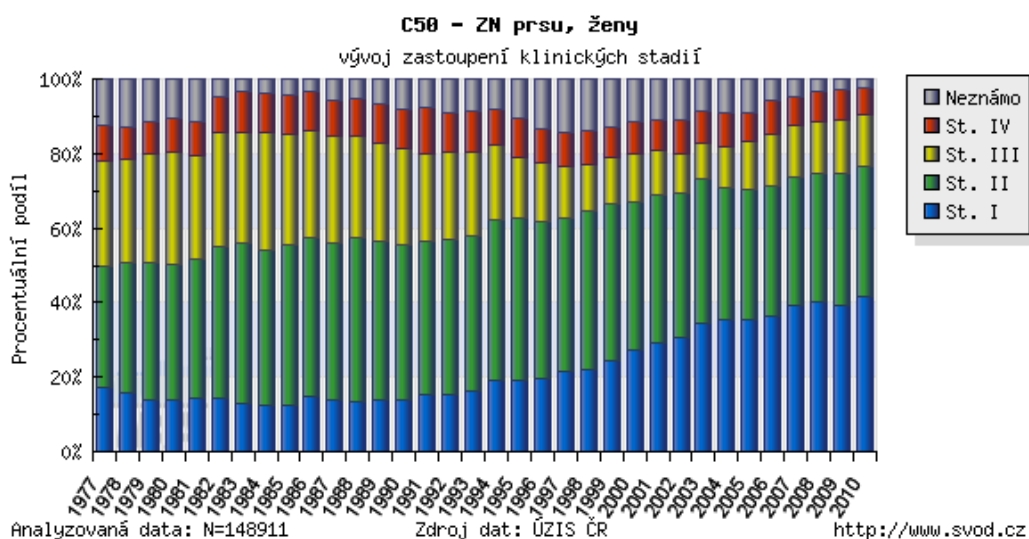
Obrázek 2: Graf vývoje incidence a mortality nádorů prsu v České republice[2]

Incidence karcinomů prsu se od zahájení jejího sledování v České republice v roce 1977 soustavně zvyšovala a k narušení tohoto trendu docházelo teprve v posledních letech (obrázek č. 2). Naproti tomu mortalita od druhé poloviny 90. let víceméně stagnuje a v posledních letech dokonce mírně klesá. Díky tomu dochází v České republice od 90. let minulého století k poklesu indexu mortality/incidence (obrázek č. 3).



Obrázek 3: Graf časového vývoje indexu mortalita/incidence pro karcinom prsu u žen v České republice[2]

Za další pozitivní trend lze považovat zvyšující se podíl patientek diagnostikovaných v nižších stádiích onemocnění (v roce 2010 bylo téměř 77 % všech patientek diagnostikováno v klinickém stádiu I a II), kdy je úspěšnost terapie nejvyšší (obrázek č. 4).



Obrázek 4: Graf vývoje zastoupení klinických stadií v době diagnózy karcinomu prsu u žen v České republice[2]

Incidence karcinomu prsu se zvyšuje s přibývajícím věkem a nejvyšších hodnot dosahuje v 6. dekádě věku. Před 20. rokem je výskyt karcinomu prsu velice vzácný. Mortalita nevykazuje tak strmý nárůst jako incidence a nejvyšších hodnot dosahuje ve věkové skupině nad 75 let.

1.2.5. Etiopatogeneze

Problematika příčin vzniku karcinomu prsu je velice komplexní a několikastupňová. Podle současného stavu poznání není možné příčiny kancerogeneze jednoznačně určit, u některých však lze popsat jejich molekulárně biologickou podstatu a je také možné identifikovat rizikové faktory, které zvyšují pravděpodobnost vzniku karcinomu prsu.

1.2.5.1. Etiologie a rizikové faktory vzniku karcinomu prsu

Etiologie karcinomu prsu není dosud jednoznačně objasněna. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, na jehož rozvoji se podílejí jak genetické, tak negenetické faktory.

Mezi nejzávažnější negenetické rizikové faktory patří vlivy související s hormonální estrogenní stimulací prsní tkáně, jako je ženské pohlaví (u žen se karcinom prsu vyskytuje asi 100x častěji než u mužů), věk, věk nástupu menarché a menopauzy, věk v době prvního těhotenství, počet těhotenství, porodů či potratů, délka laktace, obezita, užívání hormonálních preparátů atd.

Karcinomy se častěji vyskytují u žen s časným nástupem menarché, s vyšším věkem v době prvního těhotenství či u bezdětných a též u žen s pozdním nástupem menopauzy. Tato zjištění podporují představu karcinomu prsu coby hormonálně dependentního onemocnění, kde vyšší počet menstruačních cyklů zvyšuje riziko vzniku malignity [18]. Mezi nejvýznamnější geneticky podmíněné rizikové faktory pro vznik karcinomu prsu patří výskyt malignit v rodině (především výskyt karcinomu prsu a/nebo ovaria), nízký věk nemocných příbuzných v době diagnózy, jiné maligní onemocnění v anamnéze a genetické syndromy spojené s vyšším výskytem karcinomu prsu (blíže oddíl I., kapitoly 3 a 4). V neposlední řadě patří mezi rizikové faktory karcinomu prsu nezdravý životní styl, konkrétně nedostatek pohybu, nadměrný příjem potravy bohaté na živočišné bílkoviny, kouření, konzumace alkoholu, mastitis či jiné benigní onemocnění prsu v anamnéze či expozice ionizujícímu záření.

1.2.5.2. Patogeneze a molekulární podstata vzniku karcinomu prsu

Karcinomy prsu se vyvíjejí na základě kumulace molekulárních alterací v buňkách prsní žlázy. Obecně tyto alterace vznikají na podkladě nově vzniklých či vrozených genetických změn a jejich akumulace může být akcelerována zejména v důsledku zvýšené mitogenní signalizace při nadměrné stimulaci steroidních hormonálních receptorů [19] (např. při prolongované estrogenní stimulaci) či overexpresi tyrosinkinázových receptorů receptorové rodiny ErbB (EGFR, HER2/neu, ErbB-3, ErbB-4) [20], [21].

Existují dvě odlišné patogenetické varianty karcinomu prsu: vzácnější hereditární forma (15 %) charakterizovaná rodinným výskytem nádorového onemocnění a častější nehereditární forma (85 %) se sporadickým výskytem karcinomu prsu v populaci.[22]

Patogeneze obou variant se liší, dominantním patogenetickým mechanismem je však v obou případech hromadění mutací genů, které deregulují kritické signálně-transdukční cesty (buněčného dělení, apoptózy a reparace genomové DNA), většinou prostřednictvím aktivace protoonkogenů a inaktivace tumorsupresorových genů. Na podkladě těchto deregulací vzniká maligně transformovaná buňka *in situ*. Ta může vzhledem ke genomové nestabilitě, jež je způsobena poruchami DNA reparačních mechanismů, proliferovat a vytvářet další geneticky nestabilní dceřiné buňky tolerující genomové defekty, které způsobují další alterace regulačních mechanismů, a vedou tak k rozvoji invazivního karcinomu. [23], [24] Soubor genů, u kterých byla prokázána souvislost se vznikem a progresí karcinomu prsu, není při současném stupni poznání konečný.

Zatímco pro aktivaci protoonkogenu¹, který je fyziologicky v buňce přítomen, na onkogen, který vede k tumorogenezi, postačuje mutace či zvýšená exprese pouze jedné genové kopie, dochází u tumorsupresorových genů ke ztrátě funkce, jsou-li inaktivovány obě alely. Prostřednictvím Knudsonovy teorie dvojího zásahu byl demonstrován rozdíl v tumorogenezi u dědičných a sporadických forem nádorů [25].

V případě hereditární varianty karcinomu prsu nesou postižené osoby zděděnou inaktivující mutaci jedné alely ve všech svých somatických buňkách. Zbylá funkční alela je pak v cílové buňce inaktivována somatickou mutací během života jedince a iniciuje změny v genomu, jež v konečném důsledku vedou ke vzniku nádorového onemocnění. Riziko vzniku karcinomu je tudíž u nosiček patogenní mutace v některém z predispozičních genů výrazně vyšší než u sporadické formy. Inaktivujícím defektem v genech predisponujících ke vzniku hereditární formy karcinomu prsu může být bodová mutace či dlouhá delece, která se projeví jako ztráta heterozygoty („loss of heterozygosity“, LOH)[26].

U sporadických karcinomů musí v cílové buňce dojít k inaktivaci obou alel tumorsupresorového genu spontánně během života daného jedince, což je méně pravděpodobné a zřejmě to souvisí s pozdějším nástupem onemocnění. Sporadická forma karcinomu prsu tak představuje spíše polygenní onemocnění, u něhož lze prokázat postižení celé řady genů. Kromě běžných změn v primární sekvenci tu v tumorogenezi pravděpodobně hrají významnou roli též

¹ Aktivace onkogenu bodovou mutací je vzácná, častěji se jedná o genovou amplifikaci celého regionu s onkogenem.

vlivy epigenetické (např. hypermetylace promotorových oblastí), mutace v regulačních oblastech ovlivňujících transkripci [27] stejně jako faktory vnějšího prostředí.

Hereditární forma karcinomu prsu, vyvíjející se v důsledku zárodečné mutace predisponujícího genu, je často spojena s nižším věkem v době diagnózy a s výskytem bilaterálního karcinomu. Kromě karcinomu prsu jsou nosiči patogenní mutace v predisponujícím genu též ohroženi rozvojem maligního onemocnění v jiné lokalizaci, např. kolorektálního karcinomu, karcinomu prostaty či karcinomu pankreatu. [28-31]

Byla popsána řada genů, které jsou pro patogenezi hereditárního karcinomu prsu významné. Mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* jsou spojeny s velmi vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu a ovarií a jsou odpovědné za většinu všech případů hereditárního karcinomu prsu (blíže oddíl I., kapitola 3 a 4). Proč mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* predominují právě ke vzniku karcinomu prsu a ovarií není dosud jednoznačně vysvětleno. Geny *TP53*, *PTEN* a *LKB1/STK11*, které též výrazně zvyšují riziko karcinomu prsu, jsou spojené s relativně vzácnými nádorovými syndromy – Li-Fraumeniho syndrom (*TP53*), Cowdenův syndrom (*PTEN*) a Peutz-Jeghersův syndrom (*LKB1/STK11*). Geny se střední a nízkou penetrancí modifikují riziko vzniku karcinomu prsu v menší míře a patří mezi ně geny *ATM*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *TGFβ1*, *CASP-8*, *RAD51C*, *BACH1* a *BRIP1*. [32] Míra, do jaké uvedené geny zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu, je předmětem probíhajících studií. [24] Na základě rozsáhlých asociačních studií byla v nedávné době vytipována v rámci celého genomu řada častých bodových polymorfismů („single nucleotide polymorphism“, SNP), které sice riziko vzniku karcinomu prsu samostatně zvyšují jen minimálně, ale u nichž se vzhledem k jejich vysoké frekvenci v populaci předpokládá synergický efekt [33] (podrobněji oddíl I., kapitola 3.3).

1.2.6. Příznaky karcinomu prsu

Naprostá většina zachycených karcinomů, ať již invazivních či neinvazivních, je v době diagnózy zcela asymptomatická. Mezi nejčastější klinické příznaky vedoucí k diagnóze patří hmatná nebolestivá rezistence v prsu. Rezistence spojená s citlivostí či bolestivostí se objevuje jen asi v 15 % všech případů. Samotná mastodynie (bolest prsu) bez jiných klinických příznaků vede k diagnóze pouze v 5 % případů.

Dalšími symptomy mohou být změny pokožky prsu (např. zarudnutí, inflamace, retrakce, zesílení a zarudnutí kůže, „peau d’orange“ atd.), nově vzniklá retrakce bradavky, patologická sekrece z bradavky, ekzantém či svědění bradavky (Pagetův karcinom) a změna velikosti, symetrie či kontury prsů.

Méně časté jsou pak příznaky spojené s lokálním zduřením spádových lymfatických uzlin v axile nebo s metastatickým šířením karcinomu, výrazná únava, nechtěné hubnutí, náchyllost ke zlomeninám a další příznaky podle orgánové lokalizace metastáz. Obecně se doporučuje jakoukoliv změnu prsu či podpaží oproti běžnému stavu konzultovat bezodkladně s lékařem specialistou.

1.2.7. Diagnostika a screening

Pro úspěšnost následné terapie je u karcinomu prsu zcela zásadní časná diagnostika léze. Při podezření na maligní onemocnění prsu je prvním krokem odběr anamnézy a úvodní klinické vyšetření prsu následované diagnostickým mamografickým vyšetřením. Ultrazvukové vyšetření je rutinně využíváno při nejasném mamografickém nálezu a k posouzení eventuální lymfadenopatie. U mladších žen s nevyzrálou prsní žlázou, u nichž je mamografie nevytěžná, lze rovněž použít ultrazvukové vyšetření. Další alternativu v případě kontraindikace mamografie představuje diagnostické NMR vyšetření, které je rovněž využíváno k doplnění mamografického vyšetření u zdravých osob s vysokým rizikem karcinomu prsu[34]. Ke stanovení definitivní diagnózy je vždy nutné histopatologické potvrzení léze, a to nejčastěji metodou punkční verifikace suspektního ložiska pod mamografickou či ultrazvukovou kontrolou. Při stanovování klinického stadia onemocnění jsou využívány další zobrazovací vyšetření jako scintigrafické vyšetření skeletu, ultrazvukové vyšetření břicha, rentgenové vyšetření srdce a plic, CT či PET/CT vyšetření atp.

Mamografický screening karcinomu prsu představuje metodu sekundární prevence, tj. včasného zachytu karcinomu prsu v jeho asymptomatickém stadiu. V České republice jsou ke screeningu indikovány všechny asymptomatické pacientky starší 45 let bianuálně [35]. Oficiálně byl u nás mamografický screening zahájen v září roku 2002. Odhaduje se, že do roku 2013 bylo dosaženo pokrytí 46,1 % všech indikovaných žen. V roce 2012 bylo v ČR mamografem vyšetřeno 602 099 osob a celkem bylo zachyceno 3270 případů karcinomů prsu, z toho více než 72 % ve stádiu *carcinoma in situ* a T1. [36]

Otázka přínosnosti mamografického screeningu a jeho vlivu na snížení mortality a prodloužení celkového přežití (OS) u pacientek s karcinomem prsu se opakovaně stává předmětem odborné diskuse. [37, 38]

1.2.8. Prognostické faktory

Prognostické faktory umožňují odhadnout délku přežití (případně riziko relapsu) bez ohledu na zvolenou terapii, zatímco prediktivní faktory determinují odpověď nádorového onemocnění na specifickou léčbu.

Mezi klinicky využívané prognostické a prediktivní faktory patří u karcinomu prsu věk v době diagnózy, klinické stádium onemocnění vycházející z klasifikace TNM (tabulka č. 2 a 3), velikost primárního nádoru, stav axilárních lymfatických uzlin, nádorový grade dle nottinghamské modifikace Bloom-Richardsonova systému, histologický podtyp, status hormonálních receptorů, mitotický index, exprese receptoru HER2/neu, invaze krevních a lymfatických cév a odpověď na neoadjuvantní chemoterapii. [39]

T: Primární nádor	
TX	primární nádor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního nádoru
Tis	duktální karcinom nebo lobulární karcinom <i>in situ</i> , Pagetova choroba
T1	nádor 2 cm v největším rozměru
T1mi	mikroinvaze do 0,1 cm v největším rozměru
T1a	větší než 0,1 cm, ne však více než 0,5 cm v největším rozměru
T1b	větší než 0,5 cm, ne však více než 1 cm v největším rozměru
T1c	větší než 1 cm, ne však více než 2 cm v největším rozměru
T2	nádor větší než 2 cm, ne však více než 5 cm v největším rozměru
T3	nádor větší než 5 cm v největším rozměru
T4	nádor jakékoliv velikosti s přímým šířením do stěny hrudní nebo kůže
T4a	šíření na stěnu hrudní (nezahrnuje invazi pouze do m. pectoralis)
T4b	stejnostranné ulcerace, satelitní kožní uzly, edém kůže (včetně peau d'orange)
T4c	současně obě výše uvedená kritéria 4a a 4b
T4d	inflamatorní karcinom
N: Regionální mízní uzliny	
NX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit (např. dříve odstraněné)
N0	v regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
N1	metastázy v pohyblivé stejnostranné axilární mízní uzlině (uzlinách)
N2	metastázy ve stejnostranné axilární mízní uzlině (uzlinách), které jsou fixované navzájem nebo k jiným strukturám
N3	metastázy ve stejnostranných mízních uzlinách podél a. mammaria interna
M: Vzdálené metastázy	
MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	bez vzdálených metastáz
M1	vzdálené metastázy

Tabulka 2: Karcinom prsu, klasifikace TNM [40]

Karcinom prsu – rozdělení do stadií (staging)			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T0, T1	N1mi	M0
Stadium IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
Stadium IIIB	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	jakékoliv T	N3	M0
Stadium IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

Tabulka 3: Karcinom prsu, rozdělení do stadií (staging), podle [40]

K dalším zvažovaným prognostickým a prediktivním faktorům se řadí profil genové exprese (kapitola I., oddíl 1.2.3.), overexprese uPA (inhibitor aktivátorů plazminogenu) a PAI/1 (urokinázový typ aktivátoru plazminogenu), výskyt mikrometastáz v kostní dřeni, mutace genu *TP53*, hladiny cathepsinu D, analýza DNA ploidity a nádorová angiogeneze („microvessel density“).[41, 42]

V posledním desetiletí se na poli prognostiky a predikce karcinomu prsu rozvíjí trend analýzy multiparametrové genové exprese v nádorových buňkách. Na základě stanovení genového profilu aktivace proliferačních tras, chemosenzitivity, nádorové biologie atp. lze pacienty stratifikovat do skupin dle různých klinických parametrů.[43] První z genomických testů, který je v České republice od roku 2014 hrazen z prostředků všeobecného zdravotního pojištění, Oncotype Dx, stanovuje na základě analýzy exprese 21 vybraných genů pravděpodobnost recidivy, možný přínos chemoterapie u invazivního karcinomu prsu a pravděpodobnost recidivy u duktálního karcinomu *in situ*. [44] Další multiparametrické testy genové exprese, jako je MammaPrint (analýza 70 genů), či Rotterdam Signature (76 genů) vykazují nadějně výsledky, ale k jejich zařazení do klinické praxe je nezbytné provedení dalších klinických hodnocení.

1.2.9. Léčba karcinomu prsu

Strategie léčby karcinomu prsu je závislá na histopatologickém typu a subtypu nádoru, stádiu onemocnění, výsledku imunohistochemického vyšetření, celkovém stavu pacienta, aktuálním hormonálním stavu, na velikosti prsu, na přání pacientky a nově též v indikovaných případech na výsledku testu genové exprese. U lokalizovaných onemocnění (klinické stádium I-III) je

základem terapie kurativní chirurgický výkon, doplněný eventuálně dalšími léčebnými modalitami v neoadjuvantním či neoadjuvantním podání. U metastatického onemocnění (klinické stádium IV) není většinou chirurgický výkon přínosem a cíl systémové léčby je převážně paliativní. Hlavní terapeutické modalitty v léčbě karcinomu prsu zahrnují kromě chirurgického výkonu radiační léčbu, chemoterapii, hormonální terapii a cílenou (biologickou) léčbu. Při vhodném umístění a menším rozměru nádoru lze provést parciální (prs šetřící) chirurgický výkon, který následuje adjuvantní radioterapie. Nádory většího rozměru je možné zmenšit („downstaging“) neoadjuvantní chemoterapií, a dosáhnout tak jejich operability. V opačném případě je indikováno odnětí celého prsu (mastektomie). Postižení lymfatických uzlin je hodnoceno biopsií sentinelové (hlídkové) uzliny, pokud tato obsahuje nádor, provádí se exenterace axily.

Chemoterapie se podává v časných (neoadjuvantně i adjuvantně) i v pokročilých stádiích onemocnění a lze ji použít u všech typů karcinomu prsu, který je citlivý k relativně široké škále cytostatik. Hormonální léčba se používá u pacientů s hormonálně dependentním karcinomem prsu a je založena na snížení promitotické estrogenní stimulace. Biologická léčba cílí přímo na molekulární mechanismy specifické pro nádorové buňky. U karcinomu prsu se používá i v adjuvantní terapii. Pro pacienty s hereditární formou karcinomu prsu na podkladě mutace v genech *BRCA1/2* se v současnosti testuje preparát fungující prostřednictvím inhibice poly-(ADP-ribózo) polymerázy (PARP)[45] (podrobněji v oddíle I., kapitola 4.2.2.2).

2. Geny spojené s vyšším rizikem vzniku karcinomu prsu a ovarií

Přímý vliv na patogenezi karcinomu prsu a ovarií byl prokázán u řady genů, které kódují proteiny zapojené do regulace buněčného cyklu a reparace DNA. Tyto děje jsou klíčové k udržení integrity genomu. Do skupiny genů zapojených do procesu reparace dvouřetězcových zlomů DNA patří geny kódující jak proteiny, které mají za úkol dvouřetězcové zlomy detekovat, např. protein ATM a proteiny MRN komplexu (MRE11, RAD50, NBN), tak proteiny, jež se účastní přenosu a amplifikace signálu od senzorických na efektorové proteiny (jako např. CHK2), dále pak geny kódující vlastní výkonné proteiny, které přímo regulují či katalyzují reparační pochody (BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD51), a geny kódující proteiny účastníci se kontroly restričních bodů buněčného cyklu nebo aktivace apoptózy (p53).[24]

Podle míry rizika se geny predisponující ke vzniku karcinomu prsu a ovaria dělí na geny s vysokou, střední a nízkou penetrancí. Zatímco u nosičů patogenních mutací v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* je pravděpodobnost vzniku onemocnění vysoká (geny s vysokou penetrancí), u dalších genů je riziko vzniku onemocnění oproti běžné populaci

středně či málo zvýšené (geny se střední a nízkou penetrancí). Pravděpodobnost rozvoje nádorového onemocnění nosiče je vyjádřena pomocí relativního rizika (RR), které je definováno jako poměr incidence karcinomu prsu u nosičů oproti jeho incidenci v běžné populaci.

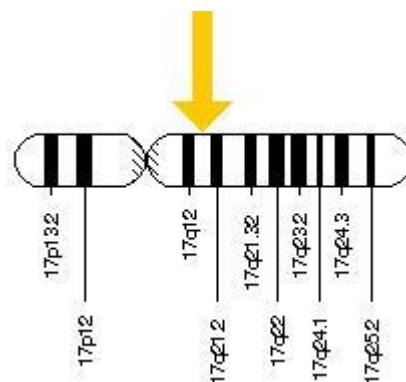
2.1. Geny s vysokou penetrancí

Za hlavní geny predisponující ke vzniku karcinomu prsu s vysokou penetrancí jsou považovány *BRCA1*, *BRCA2* a *TP53*.

2.1.1.1. *BRCA 1*

2.1.1.2. Struktura genu

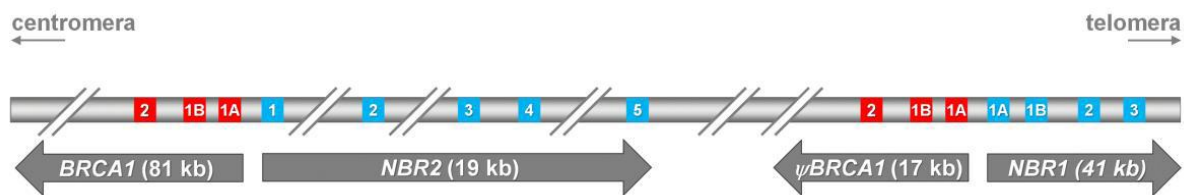
Oblast DNA, jež je spojována s časným rozvojem karcinomu prsu, byla lokalizována na dlouhém raménku chromozomu 17 (17q21) v roce 1990 [46] (obrázek č. 5). Sekvence odpovídající genu *BRCA1* pak byla identifikována v roce 1994 [47].



Obrázek 5: Umístění genu *BRCA1* na chromozomu 17[48]

Gen *BRCA1* (OMIM 113705) obsahuje 24 exonů, z nichž 22 je kódujících (5592 bp). Jeho produktem je jaderný fosfoprotein o 1863 aminokyselinách. [47], [49] V původní práci Mikiho et al. byla vymezená Alu sekvence vedoucí ke vzniku předčasného stop kodónu označena jako exon 4, proto jsou nyní exony i příslušné introny číslovány 1-3 a 5-24 (GenBank U14680, L78833). Nejdelší je exon 11, který obsahuje více než 60 % kódující sekvence celého genu, zatímco ostatní exony jsou výrazně kratší. Celá genomická oblast, jež kóduje gen *BRCA1*, vykazuje nezvykle vysokou hustotu repetitivních sekvencí (až 42 %)[49]. V blízkosti 5' konce genu *BRCA1* se v „head to head“ postavení nachází gen *NBR2* („Neighbor of *BRCA1* gene 2“), který s genem *BRCA1* sdílí obousměrný promotor, a jejich startovací transkripční místa jsou od sebe vzdálená jen 218 bp. Asi 30 kb od genu *BRCA1* směrem k telomeře je umístěna stejně

orientovaná, zřejmě duplikací vzniklá dvojice genů – pseudogen *BRCA1* (Ψ *BRCA1*), který je tvořen pouze exony 1a, 1b, 2 a přílehlými introny, a gen *NBR1* (obrázek č. 6). [50, 51] Vysoká homologie mezi 5' konci genů *BRCA1* a Ψ *BRCA1* a mezi *NBR1* a *NBR2* spolu s vysokou denzitou repetitivních sekvencí pravděpodobně vede ke vzniku řady rozsáhlých delecí zasahujících lokus *BRCA1*. [52]

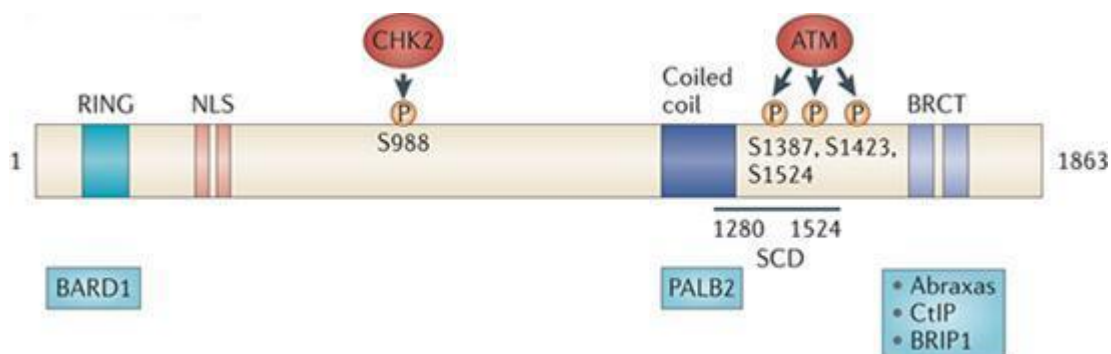


Obrázek 6: Schéma duplikované oblasti chromozomu 17q21 [51]. Oblasti homologie mezi *NBR1* a *NBR2* a mezi Ψ *BRCA1* a *BRCA1* znázorňují čtverce. Směr transkripce jednotlivých genů ukazují šipky.

U genu *BRCA1* byly popsány dva odlišné první exony (1a a 1b). Ačkoliv mají oba exony různé upstreamové promotory a vedou ke vzniku rozdílných transkriptů, otevřený čtecí rámec začíná pro oba ve stejné pozici v exonu 2, takže je jimi vždy kódován protein o stejné délce. Transkript exonu 1a je primárně exprimován v mléčné žláze a transkript exonu 1b v placentě a v dalších orgánech.

2.1.1.3. Struktura a funkce proteinového produktu

Protein *BRCA1* je nukleární fosfoprotein tvořený 1863 aminokyselinami o molekulární hmotnosti 220 kDa. Patří tak mezi největší lidské proteiny. Na obou jeho koncích byly rozpoznány vysoce konzervativní interakční domény, které jsou typické i pro jiné proteiny - na N-konci tzv. doména „RING finger“ a na C-konci dvě tandemové domény BRCT („*BRCA1* C terminal domain“) (obrázek č. 7).



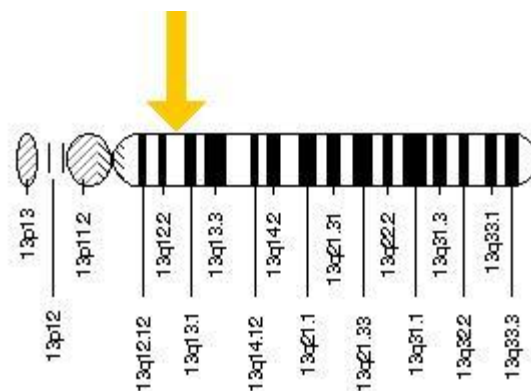
Obrázek 7: Uspořádání interakčních domén proteinu BRCA1, upraveno podle [53]

„RING finger“ doména, pro niž je charakteristický proteinový motiv tzv. zinkového prstu (v proteinové smyčce jsou protilehlé struktury spojeny dvojmocným iontem zinku v interakci se dvěma cysteiny a dvěma histidiny), zahrnuje aminokyseliny 24 – 64[47]. „RING finger“ doménu obsahuje řada proteinů s E3 ubikvitin ligázovou aktivitou, ve kterých se tato doména podílí na interakci s jinými proteiny či s DNA. Jelikož je monomer proteinu BRCA1 nestabilní, asociuje prostřednictvím své RING domény s RING doménou proteinu BARD1 („BRCA1-associated RING domain protein 1“) a vytváří tak stabilní heterodimer s E3 ubikvitin ligázovou aktivitou důležitou v procesech opravy DNA.[54] C-koncová oblast proteinu BRCA1 je označována jako transaktivační doména a obsahuje dvě tandemové BRCT domény - BRCT-N (aminokyseliny 1653-1736) a BRCT-C (aminokyseliny 1760-1855), v nichž se nalézají okrsky hydrofóbních aminokyselin, jež jsou schopny vázat fosforylované proteiny [55]. BRCT domény vytvářejí díky specifickým interakcím homo- i heteroproteinové komplexy a mají též transkripčně aktivační funkci. Vyskytují se u řady proteinů účastnících se procesů reparace DNA a kontroly buněčného cyklu. Prostřednictvím „coiled coil“ domény interaguje protein BRCA1 s proteinem PALB2 („Partner and Localiser of BRCA2“), který váže protein BRCA2. Předpokládá se, že tato interakce je jednou ze zásadních podmínek pro spuštění procesu homologní rekombinace.[56, 57] Jaderný lokalizační signál (NLS1), který je důležitý pro přesun nově vzniklého proteinu do jádra buňky, se nalézá na 5' konci exonu 11.

Centrální oblast proteinu BRCA1 je složena z přibližně 1500 aminokyselin a je z větší části neuspořádaná. To způsobuje její značnou strukturní flexibilitu, což umožňuje vznik velkého množství mezimolekulárních interakcí[58], které jsou důležité pro regulaci signalizace při procesech souvisejících s poškozením DNA a pro regulaci a stabilizaci velkých proteinových komplexů, jako je např. BASC („BRCA1 genome surveillance complex“)[59] (obrázek č. 8).

2.1.2. *BRCA 2*

Gen *BRCA2* (OMIM 600185) byl objeven v roce 1994, klonován byl o rok později [70] a je lokalizován na dlouhém raménku 13. chromozomu (13q12), kde zaujímá prostor 70 kb (GenBank NT_024524) (obrázek č. 9).[71] Obsahuje celkem 27 exonů, z nichž 25 kóduje sekvenci o 10 257 nukleotidech. Jeho dva nejdelší exony 10 (c.1022-c.2137) a 11 (c.2138-c.7069) obsahují 59 % celé kódující sekvence, zatímco ostatní exony jsou relativně krátké. Lokus genu *BRCA2* se skládá ze 47 % repetitivních sekvencí, z toho 20 % zabírají Alu sekvence a dalších 27 % tvoří LINEs („long interspread elements“) a jim podobné repetice.

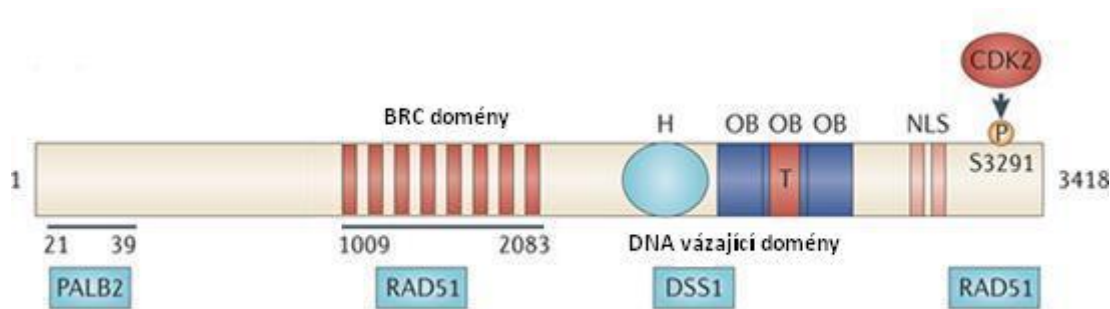


Obrázek 9: Umístění genu *BRCA2* na chromozomu 13[48]

2.1.2.1. Struktura a funkce proteinového produktu

Proteinový produkt genu *BRCA2* je tvořen 3418 aminokyselinami o celkové molekulární hmotnosti 390 kDa. Obsahuje 8 vysoce konzervovaných vazebných domén BRC, jež jsou kódovány sekvencí 11. exonu. Tyto domény, stejně jako odlišný úsek karboxylového konce proteinu *BRCA2*, jsou schopny vázat rekombinázu *RAD51*. Mezi oběma těmito úseky leží DNA-vázající domény (DBD), které váží jak jednořetězcovou DNA (ssDNA), tak dvouřetězcovou DNA (dsDNA). Na karboxylovém konci se též nachází tandemově uspořádaný lokalizační signál (NLS) [53] (obrázek č. 10).

Na rozdíl od multifunkčního potenciálu proteinu *BRCA1* spočívá základní funkce proteinu *BRCA2* v účasti na procesu homologní rekombinace, na kterém se protein *BRCA1* také spolupodílí [53]. Protein *BRCA2* se váže na rekombinázu *RAD51* a umožňuje transport *RAD51* do jádra na místo poškození. Reguluje tak formování *RAD51* nukleoproteinového filamenta, které je nezbytné pro opravu DNA pomocí HR.[72, 73]



Obrázek 10: Uspořádání interakčních domén proteinu BRCA1, upraveno podle [53]

2.1.3. Gen *TP53* a jeho proteinový produkt

Lidský tumorsupresorový gen *TP53* (OMIM191170) byl poprvé klonován v roce 1985. [74] Je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13).[75] Skládá se z 11 exonů o celkové velikosti cca 20 kb, z nichž první je nekódující a zbylých 10 kóduje protein složený z 393 aminokyselin. Jeho molekulární hmotnost je 53 kDa.

Protein p53 je transkripční faktor, jehož struktura je tvořena čtyřmi hlavními typy funkčních domén. Na N-konci se nacházejí dvě transkripčně aktivační domény, které jsou schopny vázat řadu základních transkripčních faktorů, jako je TBP („TATA box-binding protein“), TAFs („TBP-associated factors“), p62 atd. V centrální části proteinu je umístěna DNA-vazebná doména. Na C-konci se nachází oligomerizační doména, která umožňuje tvorbu tetramerů p53, nezbytných pro správnou funkci p53. Dále se na C-konci nalézá regulační doména, pomocí níž se protein může nespecificky vázat k různým formám DNA (včetně poškozené ssDNA).[76]

Vrozené mutace v genu *TP53* jsou spojeny s Li-Fraumeniho syndromem, vzácným onemocněním, v rámci něhož se může vyvinout některý z charakteristického spektra nádorů, jako jsou sarkomy, karcinomy prsu, nádory mozku a nádory měkkých tkání. Somatické mutace inaktivující obě kopie genu se nacházejí až v 50 % všech maligních nádorů. Většina (až 90 %) inaktivujících mutací byla identifikována v centrální DNA-vazebné doméně.

Po poškození DNA dochází v buňce k fosforylaci proteinu p53 kinázami ATM a CHK2. Fosforylovaný protein p53, rezistentní k ubiquitinem řízené proteasomální degradaci zprostředkované jeho negativním regulátorem (onkoproteinem Mdm2), je akumulován v buněčném jádře, tetramerizuje a indukuje transkripci genu kódující inhibitor komplexů cyklin/CDK p21^{WAF1/CIP1}, což vede k zástavě fosforylace proteinu Rb, nezbytné pro vstup buňky do S fáze buněčného cyklu. Není-li DNA opravena, aktivuje protein p53 transkripci proapoptotických genů z rodiny Bcl-2 (*Bax*, *PUMA*, *NOXA*), a indukuje tak apoptózu [77, 78].

2.2. Geny se střední a nízkou penetrancí

Řada dalších genů, jejichž alterace zvyšují riziko karcinomu prsu a některých dalších nádorových onemocnění, se vyznačuje střední či nižší penetrancí, vyšší četností a výraznou populační variabilitou v celosvětovém měřítku. Jejich soubor se neustále rozrůstá (*ATM*, *CHEK2*, *NBS1* (*NBN*), *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BARD1*, *TGFβ1*, *CASP-8* a další).

2.2.1. Gen *CHEK 2* a funkce jeho proteinového produktu

Gen *CHEK2* (OMIM 604373) je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 22 (22q12).[79] Jeho produktem je jaderná serin/threonin proteinkináza (CHK2) o molekulární hmotnosti 60 kDa. K aktivaci CHK2 dochází při poškození DNA prostřednictvím fosforylace Thr68 kinázou ATM, a to zejména v případě vzniku dvouřetězcových zlomů. Aktivovaná CHK2 proteinkináza dimerizuje a následně fosforyluje řadu proteinů podílejících se na procesech reparace DNA a na regulaci zástavy buněčného cyklu a apoptózy. Cílovými proteiny CHK2 proteinkinázy jsou mj. p53, BRCA1, Cdc25A a Cdc25C [80, 81].

Ztrátové mutace v tumorsupresivním genu *CHEK2* se u heterozygotních nosičů podílejí na zvýšení rizika řady nádorových onemocnění, např. karcinomu prsu, kolorektálního karcinomu, karcinomu prostaty, karcinomu ovarií atd.[82, 83] Nosičství ztrátové mutace jedné alely v genu *CHEK2* je konkrétně spojováno se zhruba dvojnásobným zvýšením rizika vzniku karcinomu prsu.[24]

Nejčastěji studovanou alterací představuje posunová mutace 1100delC, která je v populacích severní Evropy a Severní Ameriky označována za variantu predisponující ke vzniku karcinomu prsu.[83]

2.2.2. Gen *ATM* a funkce jeho proteinového produktu

Gen *ATM* („ataxia telangiectasia mutated“; OMIM 607585) je lokalizován na chromozomu 11 v oblasti 11q22-23 [84]. V genomové DNA zaujímá poměrně rozsáhlý úsek cca 150 kb a obsahuje 66 exonů. Kódující sekvence o velikosti 9168 bp je překládána do proteinu tvořeného 3056 aminokyselinami o celkové molekulární hmotnosti 350 kDa.[85]

Proteinem ATM je serin/threonin proteinkináza z rodiny PI3K-like kináz, lokalizovaná v jádře, kde zajišťuje rozpoznávání dvouřetězcových zlomů DNA a zprostředkovává odpověď na poškození DNA.[86] K substrátům ATM se řadí tumorsupresory p53 a BRCA1, kinázy CHK1 a CHK2, které zasahují do regulace buněčného cyklu, a proteiny RPA („replication protein A“), NBS1 (*NBN*) a FANCD2 („Fanconi anemia complementation group D2“), jež jsou zodpovědné za zastavení buněčného cyklu v S fázi [86].

Vzácné neurodegenerativní autozomálně recesivní onemocnění *ataxia telangiectasia* je spojeno s mutacemi v obou alelách genu *ATM*. Projevuje se progredující mozečkovou ataxií, okulokutánními teleangiektáziemi, zvýšenou citlivostí na ionizující záření a predispozicí ke vzniku nádorů, nejčastěji hematologických malignit.[87] U heterozygotních nosiček mutace v genu *ATM* je popisováno zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu.[80, 88]

2.2.3. Gen *NBN*

2.2.3.1. Struktura a funkce proteinového produktu

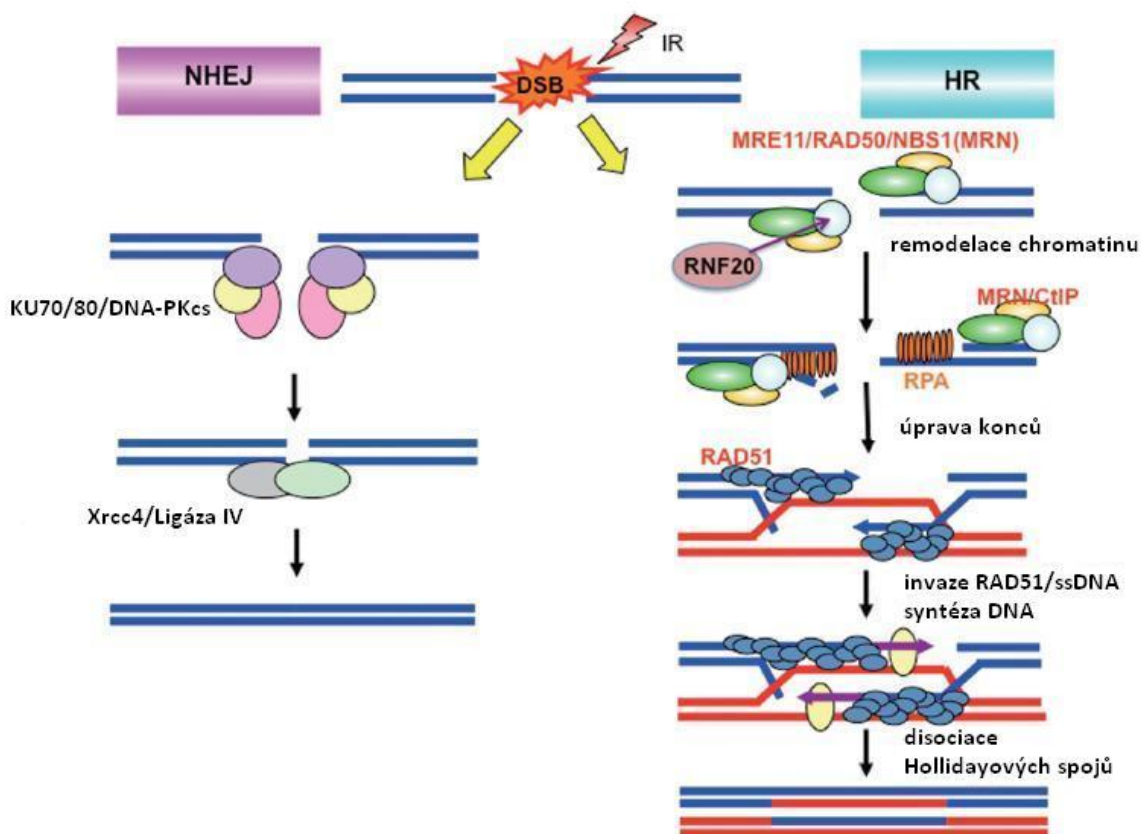
Gen *NBN* (dříve *NBS1*; OMIM 602667) byl lokalizován na chromozomu 8q21 v roce 1997 [89] a poprvé byl klonován v roce 1998 [90]. Obsahuje 16 exonů o celkové genomické velikosti téměř 50 kb.

Gen *NBN* kóduje protein o 754 aminokyselinách nazývaný nibrin. Na jeho N-konci se nachází doména FHA („forkhead-associated“) a dvě tandemově umístěné domény BRCT (obrázek č. 11). Toto uspořádání je typické pro proteiny, které specificky interagují s fosforylovanými rezidui jiných proteinů a které se často podílejí na regulaci buněčného cyklu.[91, 92] Centrální část proteinu obsahuje místa, jež jsou fosforylována ATM kinázou. Na C-konci proteinu NBN se nalézá vazebné místo pro nukleázu MRE11 a kinázu ATM. [93, 94]



Obrázek 11: Schematické znázornění domén a vazebních motivů v proteinu NBN, podle [95, 96]

Nibrin je součástí heterotrimerního komplexu MRE11/RAD50/NBN (MRN komplex), který hraje důležitou úlohu v opravách dvouřetězcových zlomů (od jejich detekce až po samotnou reparaci), a to především prostřednictvím homologní rekombinace (obrázek 12).[97]



Obrázek 12: Schéma zapojení proteinu NBN do procesu homologní rekombinace, upraveno podle [98]

Zatímco nukleáza MRE11 upravuje místo zlomu před zahájením homologní rekombinace a RAD50 zajišťuje koherenci komplexu s volnými konci DNA, zprostředkovává NBN interakci s ostatními proteiny účastnícími se odpovědi na přítomnost dvouřetězcových zlomů v buňce (např. ATM). Na základě těchto procesů vzniká velmi komplexní struktura reparačního ohniska. [24, 97, 99, 100] Kromě oprav dvouřetězcových zlomů se u nibrinu předpokládá účast při údržbě telomer [101] a při kontrole buněčného cyklu prostřednictvím interakce s ATM.[102]

Řada studií uvádí zvýšené riziko karcinomu prsu i jiných malignit (kolorektální karcinom, karcinom prostaty, hematologické malignity atp.) u heterozygotů pro mutaci 657del5. [103, 104]

2.2.3.2. NBS syndrom

U homozygotních jedinců nesoucích inaktivující mutaci genu *NBN* dochází k rozvoji vzácného autozomálně recesivního Nijmegen breakage syndromu. Klinicky se projevuje prenatální

a postnatální růstovou retardací, závažnou kongenitální mikrocefalií, imunodeficiencí, zvýšenou senzitivitou k ionizujícímu záření a zvýšeným rizikem vzniku hematologických a dalších malignit. Po 3. roce věku se vyvíjí charakteristický vzhled obličeje – vystupující střední obličejové partie a nos, ustupující nízké čelo a velké ušní boltce. V laboratorním nálezu se mj. nacházejí chromozomální zlomy s typickými translokacemi (odtud název syndromu).[105] Většina pacientů (více než 90 %) zejména slovanského původu je homozygotní pro mutaci 657del5.[106] Jen vzácně může být příčinou syndromu jiná mutace – většinou se jedná o složené heterozygoty „slovanské mutace“ s jinou mutací.[107]

3. Zárodečné mutace v predispozičních genech

Genové alterace mohou obecně vést ke snížení či ztrátě funkce genu („loss-of-function“) nebo naopak k jejímu získání („gain-of-function“). Oba tyto děje hrají důležitou roli v procesu kancerogeneze. Alterace vedoucí k získání funkce mohou způsobit přeměnu protoonkogenu na onkogen, zatímco alterace vedoucí ke ztrátě funkce mohou v procesu maligní transformace vést ke snížení či ztrátě funkce tumorsupresorových genů. Alterace v této práci popisovaných predispozičních genech jsou ztrátové, ať už nulové nebo hypomorfní. Ke ztrátě či snížení funkce predispozičního genu mohou vést jak faktory genetické (mutace), tak faktory epigenetické (DNA-metylace CpG dinukleotidů promotorových oblastí, modifikace histonů, RNA interference).[108, 109]

U genů predisponujících ke vzniku karcinomu prsu a ovaríí jsou nejčastěji identifikovanými genovými alteracemi krátké („small-scale“) inserce, delece a nesmyslné („nonsense“) mutace, méně často pak rozsáhlé („large-scale“) genomové přestavby, za něž jsou považovány dlouhé delece či duplikace rozsáhlejších oblastí genomové DNA. Tyto přestavby se mohou týkat jak jednoho či více exonů, tak vzácněji celé kódující sekvence dotyčného genu. Více než polovina všech rozsáhlých přestaveb identifikovaných v obou hlavních predispozičních genech vede k posunu čtecího rámce, k předčasnému ukončení translace, a tím ke zkrácení kódovaného proteinu. [110]

Z hlediska aplikované genetiky lze mutace v predispozičních genech dělit na patogenní (které vedou k inaktivaci výsledného proteinu a významně tak zvyšují riziko vzniku malignit), neutrální a varianty nejasného významu („variants of uncertain significance“, VUS). Ke dvěma posledně jmenovaným variantám mohou patřit jak mutace měnící smysl polypeptidového vlákna („missense“), tak intronické či krátké smysl neměnicí inserce.

Obecně je mutace považována za patogenní, vede-li k posunu čtecího rámce („frameshift“ mutace), předčasné terminaci translace a následně ke vzniku zkráceného proteinového

produktu. K patogenním mutacím se též řadí mutace měnící smysl polypeptidového vlákna („missense“) vedoucí ke změně aminokyseliny, jež je součástí důležitých funkčních domén vzniklého proteinu. K posouzení patogenity variant s nejasným významem může sloužit jak modelování struktury kódovaného proteinu a porovnání biofyzikálních vlastností chybně a správně začleněných aminokyselin, např. Align-GVGD[111], tak segregace rodin na základě onkologické anamnézy, zhodnocení histopatologických charakteristik nádoru, sestřihová analýza RNA[112] či tzv. funkční analýzy [73].

Zatímco somatické mutace získává jedinec během svého života, jsou zárodečné mutace, o nichž pojednává tato práce, předávány na potomky prostřednictvím zárodečných buněk, a vyskytují se tak téměř ve všech buňkách organismu. Vznik *de novo* zárodečných mutací v germinálních buňkách je u genů predisponujících ke karcinomu prsu vzácný.

3.1. Zárodečné mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1/2*

Asi 7 % všech diagnostikovaných karcinomů prsu [113] a 14 % všech invazivních ovariálních karcinomů [114] souvisí s přítomností zárodečné mutace v predispozičních genech. Z toho se více než 80 % nalézá v hlavních predispozičních genech *BRCA1/2*. [115] Celosvětově bylo na přítomnost mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* do dnešního dne testováno více než 1 milion osob. Doposud bylo identifikováno více než 1800 různých variant mutací v genu *BRCA1* a zhruba 2000 mutací v genu *BRCA2*. [116]

V genu *BRCA1* se patogenní „missense“ mutace nalézají zejména v terminálních interakčních doménách (RING finger a BRCT), které jsou stěžejní pro reparační funkci proteinu *BRCA1* [117], zatímco v genu *BRCA2* se patogenní „missense“ mutace nacházejí především v DNA-vázající doméně. [118]

70 % všech mutací identifikovaných v genu *BRCA1* tvoří krátké („small-scale“) mutace. V genu *BRCA2* jsou tyto mutace zachyceny až v 90 % případů. [119] Rozsáhlé („large-scale“), ale především intragenové, přestavby se vyskytují v obou *BRCA* genech, častěji pak v genu *BRCA1*, kde tvoří téměř 14 % všech mutací. Vznikají pravděpodobně v důsledku vysoké denzity Alu sekvencí v intronových oblastech genu *BRCA1*. V genu *BRCA2* zaujímají rozsáhlé genomové přestavby jen asi 2,6 % všech mutací. [120] Uvedená frekvence rozsáhlých genomových alterací v genu *BRCA1* přibližně odpovídá výsledku analýzy provedené na našem pracovišti [26] (tabulka č. 6). Naproti tomu rozsáhlé genomové přestavby v genu *BRCA2* nebyly v české populaci zaznamenány.

V běžné populaci je frekvence mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* odhadována na 1:800 až 1:400 (0,13 - 0,2 %). [121] Populačně genetické studie dokazují, že mutace vzniklé *de novo*

jsou velmi vzácné a že některé mutace je možné vysledovat až do období před naším letopočtem.[122] Tyto populačně specifické mutace („founder mutations“) byly popsány v mnoha studiích po celém světě. Předpokládá se, že původně vznikly u menšího počtu jedinců, tzv. zakladatelů dané populace, a že se v této populaci přenášely z generace na generaci. V případě uzavřených populací (nábožensky či geograficky) je proto jejich frekvence výrazně zvýšená. Až 3 % aškenázských Židů jsou nosiči jedné z mutací *BRCA1* 185delAG¹, *BRCA1* 5382insC či *BRCA2* 6174delT [123], a mutace *BRCA1* 185delAG se dokonce vyskytuje až u 20 % všech pacientek s karcinomem prsu v židovské populaci aškenázského původu.[124] Mutace 5382insC, která byla v této populaci zaznamenána v cca 0,1 %, se vyskytuje celosvětově, avšak s nejvyšší frekvencí v Polsku, Rusku a ostatních zemích východní Evropy. Na rozdíl od většiny ostatních se v islandské populaci nejčastější populačně specifická mutace nachází v genu *BRCA2*. Konkrétně se jedná o *BRCA2* 999del5, která je odpovědná za většinu hereditárních karcinomů prsu nebo ovaria diagnostikovaných na Islandu a vyskytuje se až u 0,4 % všech Islandřanů.[125] Aktuálně byla popsána populačně specifická delece exonu 9-12 v genu *BRCA1* [ex9-12del], která se nachází u 10 % všech nosičů mutací v genech *BRCA1/2* hispánského původu žijících ve Spojených státech.[126] Rozsáhlá polská studie provedená na 5042 ženách, jejichž příbuznému prvního či druhého stupně byl diagnostikován invazivní karcinom prsu před 50. rokem života či ovariální karcinom v jakémkoli věku, odhalila celkem 3,9 % nosiček jedné ze tří mutací v genu *BRCA1*, které jsou v Polsku populačně specifické - 5382insC, C61G a 4153delA.[127, 128] Vysoká frekvence mutací 5382insC a 300T>G v genu *BRCA1* byla popsána u mnoha populací ve střední a východní Evropě.[128-134] V české populaci se předpokládá poměrně vysoký výskyt populačně specifických mutací. Na našem pracovišti byly ve skupině 735 vysoce rizikových osob s karcinomem prsu nebo ovaria, které pocházely z Čech, zachyceny mutace v genu *BRCA1* u 132 pacientů (17,9 %), a mutace v genu *BRCA2* u 38 jedinců (5,2 %) (tabulky č. 4, 5 a 6).[135] Přibližně u 68,2 % (90/132) nosičů mutace v genu *BRCA1* byly identifikovány 4 frekventní mutace tohoto genu (300T>G, 1806C>T, 3819_3823del5 a 5382insC).

¹ Mutace jsou uvedeny podle běžně užívaného názvu, pokud logika textu nevyžaduje jejich poziční označení.

Spektrum bodových mutací a krátkých delecí a inzercí v genu <i>BRCA1</i> detekovaných u českých pacientů s vysokým rizikem karcinomu prsu a/nebo ovarii			
Exon/intron	Mutace dle cDNA ¹	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

¹Nomenklatura mutací: +1 odpovídá A z iniciačního kodonu v referenční sekvenci GenBankU14680; i - intron

Tabulka 4: Spektrum bodových mutací a krátkých delecí a inzercí v genu *BRCA1* detekovaných u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovarii[135]

Obdobně v moravské populaci bylo detekováno 5 nejčastěji se opakujících mutací, z toho 3 v genu *BRCA1* (300T>G, 3819_3823del5 a 5382insC) a 2 v genu *BRCA2* (c.7913_7917del5; c.8537_8538del2). Tyto mutace tvořily asi 52 % všech nalezených genových alterací.[132]. Zatímco mutace v genu *BRCA1* jsou tedy na Moravě přibližně dvakrát častější než mutace v genu *BRCA2*[132], v české populaci zahrnovaly více než 75 % všech nalezených patogenních mutací (tabulky 4 a 5)[133].

V posledních letech byly na české a moravské populaci popsány též rozsáhlé delece a přestavby v genech *BRCA 1* a *BRCA2* [26, 136]. Ve většině populací jsou rozsáhlé přestavby lokusu *BRCA1* poměrně časté a řada z nich je jedinečná, naproti tomu v genu *BRCA2* se vyskytují s nižší frekvencí nebo vůbec. Tento trend byl potvrzen i v České republice [26, 136].

Spektrum bodových mutací a krátkých delecí a inzercí v genu <i>BRCA2</i> detekovaných u českých pacientů s vysokým rizikem karcinomu prsu a/nebo ovarií			
Exon/intron	Mutace dle cDNA ¹	Předpokládaný efekt mutace	Počet rodin
2	c.231G>A	p.Met1Ile	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	c.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	p.Lys2150SerfsX25	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

¹Nomenklatura mutací: +1 odpovídá A z iniciačního kodonu v referenční sekvenci GenBankU43746; i - intron

Tabulka 5: Spektrum bodových mutací a krátkých delecí a inzercí v genu *BRCA2* detekovaných u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovarií [135]

Exony	Název mutace dle cDNA ¹	Předpokládaný efekt mutace	Počet zachycených mutací
1A-2	c..1-32787_80+4067del36934	žádný transcript?	1
1-17	c..1-21434_5075-1084del80496	ztráta ~90% kódující sekvence	4
5-10	c..1354505_670+361del15552ins35	p.Lys45Asn fsX4	1
5-14	c..135-485_4485-913del31583	p.Lys45_Lys1495del	4
13	c..4186-1787_4358-1669dup6081	p.Val1454Glu fsX7	1
13-19	c..4185+4062_5193+1650del25201	p.Gln1396_Glu1731del	1
18-22	c..5075-1135_5046+347del16316	p.Asp1692Gly fsX27	1
21-22	c..5278-492_5407-128del3779ins236	p.Ile1760_Thr1802del	2
21-24	c..5278-2135_5592+18067del25639insTAG	?	1

¹Nomenklatura mutací : +1 odpovídá A z ATG iniciačního kodonu translace v referenční sekvenci U14680

Tabulka 6: Rozsáhlé přestavby v genu *BRCA1* identifikované u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovarií [26]

Frekvence výskytu nejčastějších mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* nebyla dosud u neselektované české populace s karcinomem prsu stanovena, a její určení je jedním z cílů předkládané práce.

3.1.1. Riziko vzniku karcinomu prsu a ovarií u nosičů mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2*

Populační celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu v nezatižené ženské populaci se odhaduje na 6 -12 %, u karcinomu ovarií asi na 2 %.[2, 137-139] Nosiči mutace v genu *BRCA1* mají do 70 let věku obecně až 57% pravděpodobnost vzniku karcinomu prsu a 40% pravděpodobnost rozvoje karcinomu ovarií, zatímco nosiči mutace v genu *BRCA2* mají do 70 let věku obecně až 40% pravděpodobnost vzniku karcinomu prsu a 18% pravděpodobnost rozvoje karcinomu ovarií.[140] Interindividuální variabilita v riziku vzniku těchto malignit se připisuje jak genetickým, tak environmentálním modifikátorům rizika. [141, 142]

Starší studie, jež se zabývaly polohou mutací v rámci genu *BRCA1* a *BRCA2*, asociovaly s vyšším rizikem vzniku karcinomu ovaria patogenní mutace, které byly lokalizovány v centrální částech obou genů („ovarian cancer cluster regions“; OCCR), naproti tomu mutace v proximálních a distálních částech tohoto genu spojovaly spíše s karcinomem prsu.

Studie CIMBA potvrdila na velkém souboru pacientů, že patogenní mutace v 5' a 3' koncových oblastech genu *BRCA1* a *BRCA2* jsou spojeny s vyšším rizikem karcinomu prsu než mutace v centrálních oblastech.[141]

Kromě genetických modifikátorů, jež byly popsány pomocí GWAS („genome-wide association study“) může být variabilita v riziku vzniku karcinomu prsu a ovarií u nosičů mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* též vysvětlena tzv. modifikátory vnějšího prostředí.[142-145]

Na základě těchto genetických a environmentálních modifikátorů lze vyčlenit skupinu nosičů mutací v genu *BRCA1* vykazující nejvyšší riziko rozvoje karcinomu prsu nebo ovarií, u nichž je nosičství spojováno s až 81% pravděpodobností vzniku karcinomu prsu a 63% pravděpodobností vzniku karcinomu ovarií do 80 let věku. Obdobně nosiči mutace v genu *BRCA2* z nejrizikovější skupiny dosahují až 83% rizika vzniku karcinomu prsu.[146]

3.1.2. Klinické a histopatologické charakteristiky karcinomů prsu u pacientů s mutací v genu *BRCA1/2*

S mutací v genu *BRCA1* jsou nejčastěji spojovány duktální adenokarcinomy (74 %). V porovnání se sporadickými karcinomy je u nich častěji zastoupen medulární typ¹[147], a to až ve 13 % oproti 2 % v běžné populaci.[148] Karcinomy způsobené mutací v genu *BRCA1* jsou obvykle hůře diferenciované (grade 3), mívají vyšší mitotický index, častěji obsahují nekrotickou tkáň [149], vykazují nižší procento tubulární diferenciace a naopak vyšší míru buněčného pleomorfismu. Pro karcinomy způsobené mutací v genu *BRCA1* je charakteristická nižší exprese estrogenových receptorů alfa ($ER\alpha$), vyšší exprese estrogenových receptorů beta ($ER\beta$), nízká exprese progesteronových receptorů (PR) a nízká exprese receptoru 2 pro lidský epidermální růstový faktor 2 (HER-2/neu).

Uvedené klinické a histopatologické charakteristiky ukazují na agresivnější fenotyp nádoru způsobeného mutací v genu *BRCA1*. [150] Další imunofenotypové charakteristiky karcinomu s mutací v genu *BRCA1* jsou obdobné jako u progenitorových buněk prsu, z nichž pravděpodobně mohou tyto nádory vznikat (na rozdíl od karcinomů s mutací v genu *BRCA2*). [151] Z hlediska genetického profilování patří karcinomy odvozené z mutace v genu *BRCA1* nejčastěji k bazálnímu subtypu. [152] Z hlediska klinického pak tyto karcinomy inklinují k vyšší frekvenci vzniku plicních metastáz a metastáz do CNS. [153] Studie, jež srovnávaly celkové přežití pacientů s diagnózou karcinomu vzniklého na podkladě mutace v genu *BRCA1* s celkovým přežitím pacientů se sporadickým karcinomem prsu vyznívají nejednoznačně. Popisují buďto obdobnou, nebo zkrácenou dobu celkového přežití. [154]

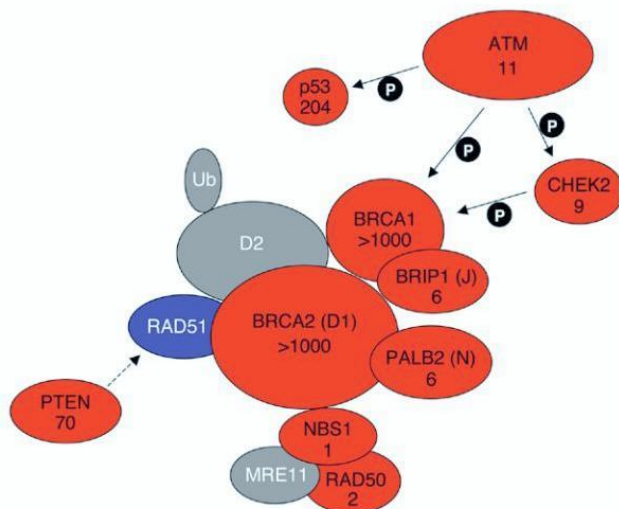
S mutací v genu *BRCA2* je podobně jako s mutací v genu *BRCA1* spojován především histopatologický typ invazivního duktálního karcinomu (76 %), navíc zde však byl častěji zaznamenán výskyt invazivního lobulárního, tubulárního nebo kribriformního typu. [148] Karcinomy způsobené mutací v genu *BRCA2* bývají středně až hůře diferenciované (grade 2-3) a podobně jako u *BRCA1* mívají vyšší mitotický index, vykazují nižší procento tubulární diferenciace a naopak vyšší míru buněčného pleomorfismu. [155] Imunofenotyp těchto karcinomů se významně neliší od fenotypu sporadických karcinomů a oproti karcinomům na podkladě mutace v genu *BRCA1* vykazuje vyšší expresi $ER\alpha$ a PR. Naopak podobně jako u karcinomů způsobených mutací v genu *BRCA1* je u nich popisována výrazně nižší exprese HER-2/neu receptorů oproti sporadickému výskytu. [156] Novější studie dále u těchto karcinomů uvádějí vyšší expresi fibroblastového růstového faktoru 1 (FGF1) a receptoru pro

¹ Frekvence karcinomů s vyšším gradem a medulárním histopatologickým typem je ještě častější ve skupině pacientů s karcinomy spojovanými s mutacemi v genu *BRCA1* pod 50 let věku.

fibroblastový růstový faktor 2 (FGFR2).[157] Většina karcinomů asociovaných s mutací v *BRCA2* se řadí k luminálnímu subtypu a často vykazuje overexpresi ER/PR/CK8/CK18, což je odlišuje od karcinomů spojovaných s mutací v *BRCA1*. U karcinomů vzniklých na podkladě mutací v genu *BRCA2* je pozorován vyšší výskyt metastáz do kostí a měkkých tkání, a to v závislosti na jejich ER pozitivitě.[153] Stejně jako u pacientů s karcinomy souvisejícími s mutacemi v genu *BRCA1* jsou data ohledně celkového přežití pacientů nejednoznačná.[154]

3.2. Zárodečné mutace v ostatních predispozičních genech

Asi 20 % invazivních karcinomů prsu, u nichž se předpokládá přítomnost patogenní mutace v predispozičních genech, je spojováno buďto s alteracemi v ostatních predispozičních genech s vysokou penetrancí (*TP53*, *PTEN*, *LKB1* a *CDH1*) nebo s alteracemi v genech s nízkou a střední penetrancí (*CHEK2*, *ATM*, *PALB2*, *BRIP1*, *RAD1C*, *RAD1D*, *NBN*, *BARD1* atd.). Schéma interakcí proteinů asociovaných se zvýšeným rizikem vzniku hereditárního karcinomu prsu je znázorněno na obrázku č. 13. [115]



Obrázek 13: Schéma interakcí proteinů asociovaných se zvýšeným rizikem vzniku hereditárního karcinomu prsu. Červeně jsou znázorněny proteiny, v jejichž genu byla identifikována zárodečná mutace (počet zárodečných mutací popsanych v daném genu uvádí číslo pod názvem proteinu). Upraveno podle [158].

Širší zapojení genů s nízkou a střední penetrancí do klinického genetického testování souvisí s rozvojem metod paralelního sekvenování („next-generation sequencing“, NGS), které umožňuje nadále rozšiřovat spektrum dalších kandidátních genů.[159]

V české populaci byl soubor vysoce rizikových pacientů analyzován na mutace v genech *ATM* (tabulka 7), *CHEK2* (tabulka 8) a *TP53* (tabulka 9).[160-162]

Exon	Název mutace dle cDNA	Předpokládaný efekt mutace	Počet zachycených mutací
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.

Tabulka 7: Spektrum mutací v genu *ATM* detekovaných u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovarií [135]

Exony	Název mutace dle cDNA	Předpokládaný efekt mutace	Počet zachycených mutací
8-9	c..909-2028_1095+330del5395	p.Met304Leu fsx16	5
10	c..1100delC	p.Thr367Met fsx15	4

Nomenklatura mutací: +1 odpovídá A z ATG iniciačního kodónu translace v referenční sekvenci NM_007194

Tabulka 8: Nejčastější mutace v genu *CHEK2* detekované u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovarií[26]

Exon	Název mutace dle cDNA	Předpokládaný efekt mutace	Počet zachycených mutací
1A-2	c..760A>G	p.Ile254Val	1
1-17	c..818G>A	p.Arg273His	1
5-10	c..815T>G	p.Val272Gly	1
21-24	c..998G>A	p.Arg333His	1

Nomenklatura mutací: +1 odpovídá A z ATG iniciačního kodónu v referenční sekvenci NM_000546

Tabulka 9: Spektrum mutací v genu *TP53* detekovaných u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovarií [162]

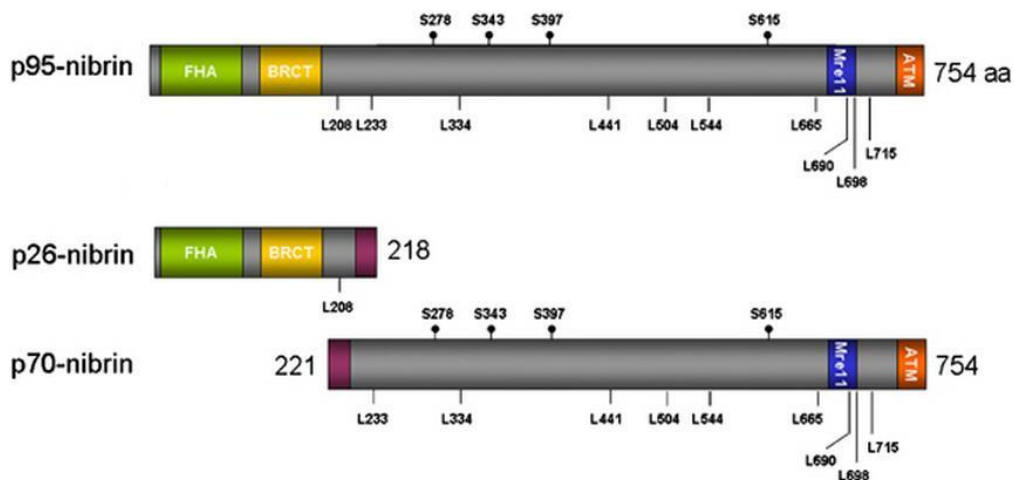
3.2.1. *NBN*

Nejčastější mutací v genu *NBN* u nemocných s Nijmegen breakage syndromem (více než 90 %) představuje patogenní mutace c.657-661del5 v exonu 6.[90]

Kromě této mutace bylo u pacientů s NBS prozatím zaznamenáno dalších 11 patogenních mutací, které buďto mění smysl polypeptidového vlákna („missense“ mutace) nebo vedou ke zkrácení vzniklého proteinového produktu.[163] U nosičů mutace v genu *NBN* bylo popsáno zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění, především karcinomu prsu, karcinomu ovarií, kolorektálního karcinomu, maligního melanomu, karcinomu prostaty a leukémií a NHL [104, 164-168]. Ve skupinách pacientů s nádorovým onemocněním byly jako nejčastější identifikovány tři mutace: výše zmíněná 657del5 a dále R215W(c.643C>T) a I171V (c.511 A>G).[104, 164, 167, 169]

Mutace 657del5 je hypomorfní, neboť vede ke vzniku dvou zkrácených fragmentů proteinu NBN. Zatímco N-terminální fragment (p26-nibrin) o hmotnosti 26 kD vzniká z řádného translačního iniciačního kodónu a je ukončen delecí, druhý větší fragment proteinu o hmotnosti 70 kD (p70-nibrin) vzniká z alternativního iniciačního kodónu a představuje terminální část proteinu. Bylo experimentálně ověřeno, že oba tyto fragmenty (obrázek č. 14) mohou částečně nahradit funkci nezkráceného proteinu.[170]

Naproti tomu mutace R215W v exonu 6 genu *NBN* vede k závažné destabilizaci vzniklého proteinu, jehož hladina u homozygotů nepřesahuje 20 %, což vede k významnému snížení aktivity kinázy ATM.[171-173] Několik studií potvrdilo zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu jak pro nosiče mutace 657del5 [174, 175], tak pro nosiče mutace R215W[172]. Analýza mutací v genu *NBN* nebyla doposud v České republice ve skupině vysoce rizikových pacientů provedena, a je jedním z cílů předkládané práce.

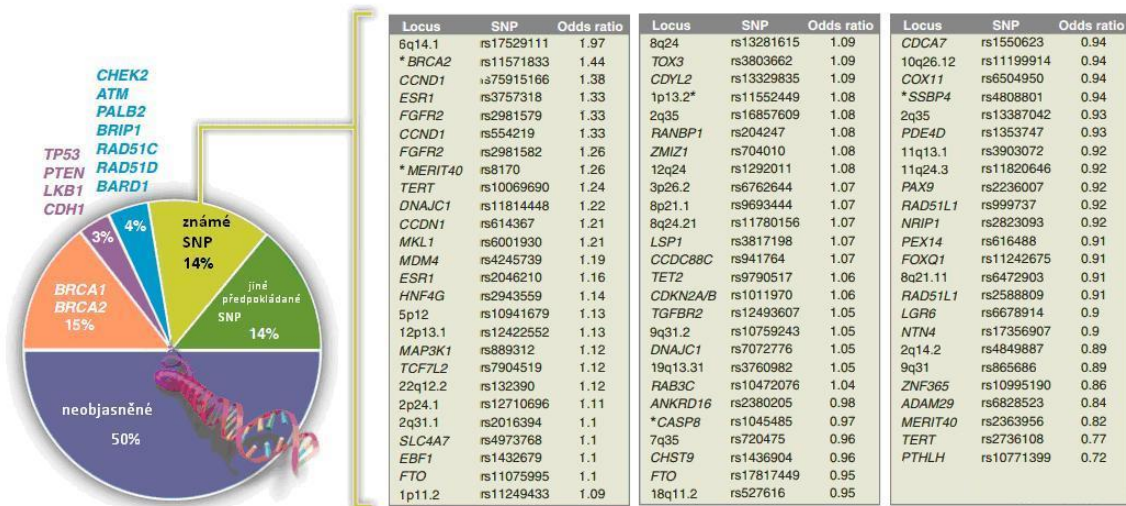


Obrázek 14: Schéma genu *NBN* (*NBS1*), jeho nezkráceného proteinového produktu a dvou proteinových fragmentů, které vznikají na základě delecce 657del5. Zdroj: [95].

3.3. Polygenní riziko vzniku karcinomu prsu

Rodinný výskyt karcinomu prsu je závažným rizikovým faktorem. U celkem 15 % pacientek s diagnózou invazivního karcinomu prsu se v rodinné anamnéze vyskytuje nejméně jedna příbuzná prvního stupně s invazivním karcinomem prsu. Navýšení hodnoty relativního rizika vzniku karcinomu prsu, které z příbuzenského vztahu s nemocnou vychází, je jen zčásti vysvětlitelné zděděnou mutací v některém z definovaných predispozičních genů (obrázek č. 15). Na základě asociačních studií (GWAS) na rozsáhlých souborech pacientů s karcinomem prsu a zdravých kontrol byly identifikovány obvyklé (10-50 % populace) genetické varianty v 76 lokusech, které jsou spojeny s nepodstatným (méně než 1,5násobným)

navýšením rizika vzniku karcinomu prsu. V současnosti se předpokládá, že asi 28% podíl na riziku spojeném s familiárním výskytem karcinomu prsu lze vysvětlit synergickým efektem genetických alterací v těchto lokusech, z toho celkem 14 % nebylo zatím identifikováno (obrázek č. 15).[176, 177]



Obrázek 15: Genetické alterace predisponující ke karcinomu prsu. Graf vlevo ukazuje, do jaké míry se jednotlivé varianty podílejí na familiárním riziku. Tabulka uvádí lokus, kde se jednonukleotidový polymorfismus („SNP“) nachází, jeho označení a míru navýšení rizika („odds ratio“). Upraveno podle [33].

4. Klinické aspekty

Podle způsobu výskytu karcinomu prsu v rodinách se rozlišuje hereditární, familiární a sporadická forma výskytu onemocnění.

Hereditární forma bývá charakterizována autosomálně dominantním přenosem patogenních mutací ve vysoce penetrantních genech, nižším věkem v době diagnózy (v porovnání se sporadickým karcinomem prsu asi o 10-15 let dříve), častou přítomností nádorové duplicity (či multiplicity) a bilaterálním či multifokálním karcinomem prsu.[178]

Pokud je v rodině pozorován vyšší výskyt karcinomu prsu než v běžné populaci, ale nelze vysledovat specifický způsob dědičnosti, hovoříme o tzv. familiární formě karcinomu prsu, která je pravděpodobně způsobena kombinací efektu středně a nízkopenetrantních predispozičních genů a faktorů prostředí. Většina genetických alterací, u nichž se předpokládá spoluúčast na rozvoji familiární formy karcinomu prsu, není zatím jasně identifikována.

U sporadické formy karcinomu pak nelze vysledovat dědičnost karcinomu prsu v rodině pacienta.[179]

Tato klasifikace má za úkol pomáhat klinickým genetikům stanovit riziko vzniku karcinomu prsu u vyšetřované osoby a pomoci rozhodnout, zda má být provedeno genetické vyšetření v rodině, případně u jakých jejích členů a jaké geny či mutace mají být testovány. Rozdělení jednotlivých forem výskytu karcinomu prsu v klinické praxi však často není takto jednoznačné, například některé rodiny se zdánlivě sporadickým výskytem onemocnění mohou být na základě nových poznatků o nízkopenetrantních genových alteracích překvalifikovány na rodiny s familiární formou výskytu onemocnění.

4.1. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií

Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií („hereditary breast and ovarian cancer syndrome“, HBOC) lze definovat podle charakteristických znaků uvedených v tabulce č. 10, která byla upravena podle nejnovějších doporučení americké organizace NCCN (National Comprehensive Cancer Network) [180].

Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií (HBOC)
Charakteristické znaky
<ul style="list-style-type: none"> • autosomálně dominantní přenos specifické genetické alterace s vysokou patogenitou a penetrancí • časný nástup onemocnění • výskyt nádorů prsu či ovarií v rodině • výskyt bilaterálního karcinomu prsu a/nebo ovarií v rodině • výskyt duplicitního karcinomu prsu a ovarií (jedinci s karcinomem v obou lokalizacích) v rodině • výskyt nádorových onemocnění v jiných lokalizacích¹ v rodině • výskyt karcinomu prsu u mužských členů rodiny

¹zejména karcinom prostaty, kolorektální karcinom, karcinom pankreatu a maligní melanom

Tabulka 10: Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií, charakteristické znaky, podle [181, 182]

V rámci výzkumu dědičnosti karcinomu prsu byla identifikována celá řada predisponujících genů, zásadní klinický význam však mají pouze patogenní mutace s vysokou penetrancí v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2*, které u svých nosičů mohou vést k rozvoji symptomů pozorovaných v rámci syndromu HBOC.

Se syndromem HBOC mohou být asociovány další klinické syndromy, jako např. Li-Fraumeniho syndrom (*TP53*), Cowdenův syndrom (*PTEN*) atp., které jsou definovány na základě specifické alterace v jednom z vysoce penetrantních predispozičních genů a pro něž je též charakteristické významně zvýšené celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu či ovarií. Spektrum typických nádorových diagnóz v rodinách postižených těmito syndromy se však od syndromu HBOC liší.[179]

Jen asi 25 % všech případů karcinomu prsu, u nichž je zvýšené riziko výskytu spojeno s pozitivní rodinnou anamnézou, vysvětluje přítomnost patogenní mutace v genech s vysokou a střední penetrancí.[177] Zbývajících 75 % je připisováno alteracím a polymorfismům v řadě dalších predispozičních genů s nízkou penetrancí [33], vytipovaných na základě asociačních studií (GWAS) a analýz, které sice ovlivňují riziko vzniku karcinomu prsu často jen velmi slabě, ale vzhledem k jejich relativně vysoké alelické frekvenci se předpokládá jejich synergický účinek [24, 177]. V neposlední řadě se může HBOC typický fenotyp vyskytovat i u jedinců, u nichž nebyla současnými metodami detekována žádná genetická příčina.[179] I v takovém případě by se měla preventivní opatření shodovat s rozsahem opatření stanovených pro nosiče s identifikovanou mutací v hlavních predispozičních genech.[179]

4.2. Genetické vyšetření a genetické poradenství

Genetické vyšetření (a následné poradenství) představuje několikafázový proces. Nejdříve jsou lékařem prvního kontaktu (např. praktický lékař či klinický onkolog) zjištěny vstupní informace [180] a při podezření na genetický původ nádorového onemocnění by měl být adept na vyšetření odeslán do specializovaného centra, kde mu je odebrána osobní a rodinná anamnéza (3- a 4generační rodokmen). V případě karcinomu prsu je pozornost věnována zejména: věku v době diagnózy, „triple-negativnímu“ histopatologickému typu, vertikálnímu přenosu onemocnění, míře penetrance, bilaterálnímu výskytu karcinomu prsu, duplicitním nádorovým onemocněním a výskytu dalších nádorových onemocnění v rodině (zejm. karcinom prsu, karcinom ovarií, karcinom prsu u muže, karcinom prostaty, karcinom pankreatu). Dále by měla být zjišťována specifická etnická příslušnost (např. příslušnost k populaci aškenázských Židů může modifikovat indikační kritéria).

Na základě zjištěných informací je u zdravých jedinců odhadnuto riziko vzniku nádorového onemocnění. U pacientů s již diagnostikovaným karcinomem prsu je pak odhadnuto, zda je jejich onemocnění spojeno s některým z hereditárních nádorových syndromů (HBOC, Li-Fraumeniho, Cowdenův či Peutz-Jeghersův syndrom) nebo zda se jedná o familiární či sporadickou formu karcinomu prsu.

Splňuje-li testovaná osoba indikační kritéria stanovená Českou onkologickou společností a Společností lékařské genetiky[181, 183] uvedená v tabulce 11, následuje samotné genetické vyšetření, které je však nedirektivní a pacient jej může odmítnout.

K molekulárně-genetickému vyšetření lze přistoupit teprve po řádném poučení testované osoby a následném podpisu písemného informovaného souhlasu. Genetické vyšetření se zahajuje u nejmladší plnoleté osoby s nádorovým onemocněním z celé rodiny.

Po odběru je biologický materiál odeslán na specializované pracoviště (např. Ústav biologie a lékařské genetiky, VFN Praha či Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, MOÚ v Brně), kde je předzpracován a uchován (preanalytická fáze). V rámci vlastní analytické fáze pak probíhá samotná analýza predispozičních genů. Nejdříve by měly být vyšetřeny populačně specifické mutace, a pokud je výsledek negativní, mělo by následovat postupné vyšetření všech kódovaných sekvencí dle správné laboratorní praxe[184] a doporučení European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) [185]. Spektrum genů rutinně vyšetřovaných u osob s vysokým rizikem geneticky podmíněného karcinomu prsu v České republice zahrnuje většinu kódující sekvence hlavních predispozičních genů *BRCA1* a *BRCA2*, které jsou testovány jak na přítomnost krátkých, tak dlouhých genových alterací, a dále 2 vybrané alterace v genu *CHEK2* (1100 delC a velká delece exonů 8-9).[181]

V postanalytické fázi jsou výsledky analýzy a jejich interpretace (popis rozsahu molekulárně genetické analýzy, použité metody včetně jejich limitace, popis patogenity nalezené mutace, klinický význam ve formě odhadovaných rizik vzniku malignit a doporučení pro možné prediktivní testování u příbuzných) zformulovány do závěrečné zprávy, jež je odeslána lékaři, který vyšetření indikoval. Ten následně testované osobě sdělí výsledek vyšetření a na jeho základě společně rozhodnou o dalším postupu.

Dle doporučení EMQN [184, 185] lze jako patogenní, způsobující onemocnění, označovat mutace, které mají prokazatelný vliv na funkci proteinu (tabulka 11).

Charakteristické znaky patogenních mutací dle doporučení EMQN
<ul style="list-style-type: none">• mutace znemožňující syntézu proteinu („nonsense“) mutace a mutace způsobující posun čtecího rámce), příp. mutace odstraňující významnou funkční doménu proteinu• mutace vedoucí k aberantnímu sestřihu mRNA (sestřihové mutace)• mutace, u nichž bylo experimentálně prokázáno poškození funkce proteinu• sekvenční varianty, u kterých byla nezvratně prokázána kosegregace s onemocněním u několika nepříbuzných rodin a které nebyly detekovány ve velké skupině kontrolních vzorků

Tabulka 11: Charakteristické znaky patogenních mutací dle EMQN [184, 185]

Sekvenční varianty, které nesplňují některou z výše uvedených podmínek, musí být posuzovány jako neklasifikovatelné.[184, 185] K určení míry patogenity sekvenčních variant slouží databáze, jako je BIC („Breast Cancer Information Core“)[116], LOVD („Leiden Open

(source) Variation Database“)[186] či závěry pracovní skupiny pro neklasifikovatelné genetické varianty IARC („International Agency of Research on Cancer“)[187].

Pozitivní výsledek genetického vyšetření znamená, že byla nalezena genetická alterace, která výrazně zvyšuje riziko vzniku maligního nádorového onemocnění. Pozitivní výsledek musí být vždy potvrzen nezávislým odběrem a detekcí již známé genové alterace. Negativní výsledek lze stanovit pouze v pozitivně testované rodině. I tento výsledek musí být vždy potvrzen. Za neurčitý je výsledek považován, není-li v rizikové rodině zachycena žádná genetická alterace, která by vysoký výskyt onemocnění v rodině vysvětlovala. Je-li zjištěna genová alterace nejasné patogenity (VUS), je výsledek vyšetření označen jako neprůkazný.

Prediktivní test lze doporučit u osob starších 18 let, u nichž je riziko přenosu mutace, která byla detekována jejich příbuznému. Mutační analýza se dále může provádět i u zdravého jedince s vysokou pravděpodobností dědičné formy nádoru prsu či ovaria, pokud nežije nikdo z nemocných příbuzných.

Podle doporučení Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP[184] je za negativní výsledek prediktivního testu považováno nenalezení dříve identifikované genové alterace. Pozitivní výsledek prediktivního testu znamená, že vyšetřovaná osoba je nosič patogenní mutace a měla by být informována o možnostech primárních a sekundárních preventivních opatření.

Na základě kombinace hodnocení významu různých rizikových faktorů, u nichž se předpokládá podíl na procesu kancerogeneze, byly vytvořeny modely predikce rizika vývoje karcinomu prsu, jako je Clausův[188], Gailův[189] či jeho česká modifikace Pecnův model[190] a BRCAPRO[191, 192], dále pak novější Tyrer-Cuzick/IBIS[193] a BOADICEA[194], které na rozdíl od starších modelů zohledňují celou škálu klinických i histopatologických charakteristik probanda.

Další modely pak mohou predikovat pravděpodobnost zachytu mutace v predispozičních genech, jako např. model Penn II.[195]

4.2.1. Indikační kritéria ke genetickému vyšetření v genech *BRCA1* a *BRCA2*

Ke genetickému vyšetření jsou indikovány osoby, u nichž lze očekávat vyšší pravděpodobnost nosičství genové alterace než u neselektované populace a které splňují alespoň jedno kritérium uvedené v tabulce č. 12. Na podkladě dosavadních výsledků vyšetřování mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* i klinické praxe zohledňují indikační kritéria ke genetickému vyšetření buď rodinnou zátěž probandky nebo specifický histologický typ nádoru anebo zvláštní charakter manifestace nádorového onemocnění.

Familiární formy
<ul style="list-style-type: none"> alespoň 3 přímí příbuzní (včetně probanda) diagnostikováni s karcinomem prsu a/nebo ovaria (bilaterální karcinom je započítáván jakožto dva nádory) 2 příbuzní (včetně probanda) prvního stupně (nebo druhého stupně paternálně) s karcinomem prsu a/nebo ovaria, z nichž alespoň jeden byl diagnostikován pod 50 let věku
Sporadické formy
<ul style="list-style-type: none"> pacientka s bilaterálním nádorem prsu nebo ovaria s první diagnózou pod 50 let věku nebo pacientka s nádorem prsu a ovaria v jakémkoliv věku sporadický výskyt unilaterálního karcinomu prsu nebo ovaria ve věku pod 35 let muž s nádorem prsu medulární a atypický medulární karcinom prsu (podle laboratoře, vhodné do 50 let) karcinom prsu s negativitou estrogenových a progesteronových receptorů a HER2/neu (podle laboratoře, vhodné do 50 let)

Tabulka 12: Indikační kritéria ke genetickému vyšetření, převzato z [181].

Nejnovější verze indikačních kritérií (1/2014) americké organizace NCCN [180] zařazuje též karcinomy prsu *in situ* a doporučuje testovat osoby se sporadickým výskytem karcinomu prsu pod 45 let věku nebo osoby s karcinomem prsu v jakémkoli věku, mají-li příbuzného s karcinomem ovaria v jakémkoli věku nebo mají-li dva příbuzné s nádorem pankreatu či prostaty anebo mají-li příbuzného s karcinomem prsu. Dále doporučuje testovat všechny osoby s diagnózou epiteliálního karcinomu ovarií, karcinomu pankreatu nebo prostaty, které mají dva nebo více příbuzných s karcinomem ovarií, prsu, pankreatu či prostaty (má-li proband v rodokmenu předky z populace aškenázských Židů, stačí k indikaci pouze jeden takový příbuzný).

ESMO[196] („European Society for Medical Oncology“) oproti českým kritériím doporučuje u familiární formy omezit věk alespoň jednoho výskytu pro první kritérium uvedené v tabulce č. 12 do 50 let věku a pro druhé kritérium do 40 let věku. U sporadických forem pak doporučuje omezit první kritérium uvedené v tabulce č. 12 na pacientky s časným nástupem onemocnění. Dále přidává jako samostatné kritérium karcinom prsu do 60 let věku u probanda, který má v rodokmenu předky z populace aškenázských Židů.

4.2.2. Klinické aspekty genetického vyšetření

Ke snížení rizika vzniku karcinomu prsu či duplicitního nádorového onemocnění se stejně jako ke snížení morbidit a mortality spojené se záchytem patogenních mutací v genech

BRCA1 a *BRCA2* využívá kombinace postupů zahrnujících specifický screeningový program, profylaktické chirurgické výkony a farmakologickou intervenci (chemoprevence či úprava standardního terapeutického postupu popsána dále). Zapojení jednotlivých modalit se liší, jedná-li se o osobu s již diagnostikovaným karcinomem prsu, zdravého nosiče mutace či osobu s různým stupněm rizika vzniku karcinomu prsu bez jasně definované genetické alterace¹.

4.2.2.1. Klinické aspekty genetického poradenství u zdravých nosiček mutace v genech *BRCA1/2*

U zdravých osob se zvýšeným rizikem genetického přenosu karcinomu prsu bez prokázané genetické alterace v hlavních predispozičních genech je specifický screeningový program modifikován podle vypočteného rizika vzniku karcinomu prsu, na jehož základě variuje v rozsahu i intenzitě od screeningového programu pro běžnou populaci (nízké riziko) až po doporučení pro nosiče mutací v hlavních predispozičních genech (vysoké riziko).

Pravidelné kontroly zdravých nosičů patogenních mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* jsou prováděny v 6měsíčních intervalech. V algoritmu sledování je zásadní vyšetření prsů, které se skládá z pravidelného samovyšetřování, z pravidelného vyšetření lékařem a z pravidelného zobrazovacího vyšetření založeného na kombinaci ultrazvukového vyšetření (UZ), mamografie (MG) a nukleární magnetické rezonance (MRI). Dále je do schématu zařazeno pravidelné vyšetření dermatologem, pravidelné gynekologické vyšetření (s transvaginálním ultrazvukem), odběr nádorových markerů, ultrazvukové vyšetření břišních orgánů, hemokult test, koloskopie atd.

Bylo prokázáno, že mamografie má značně limitovanou záchytnost časných stádií karcinomů prsu u vysoce rizikových pacientek obecně. Celých 29 % nově vzniklých karcinomů prsu, které byly diagnostikovány v rámci pravidelného palpačního vyšetření, nebylo u těchto pacientek mamografií vůbec objeveno.[197] Naproti tomu MRI prsů zachytí dvakrát více karcinomů prsu u nosiček mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* než mamografie nebo ultrazvukové vyšetření a neobjeví pouze 10 % tzv. intervalových karcinomů.² MRI tak v současnosti patří ke standardním vyšetřovacím metodám u nosiček mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* [197, 198] a míra jejího zapojení do screeningu tak představuje především logisticko-ekonomickou otázku.[199]

¹ K vyjádření míry rizika vzniku karcinomu prsu u osoby bez prokázané mutace v hlavních predispozičních genech se většinou využívají modely predikce, které obvykle skupinu stratifikují na osoby s nízkým (<10 %), středním (10-20 %) a vysokým rizikem (>20 %).

² Jedná se o karcinomy, u nichž se objeví klinické příznaky mezi dvěma screeningovými vyšetřeními.

Profylaktické chirurgické výkony jsou neefektivnější možností, jak ovlivnit celkové přežití u nosiček mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Profylaktická bilaterální mastektomie („risk-reduction-mastectomy“) snižuje v populaci zdravých nosiček riziko vzniku až o 90 %. Profylaktická salpingo-ooforektomie, která je pacientkám i nosičkám navrhována po 35. roku věku („risk-reduction-salpingo-oophorectomy“) se stala standardním profylaktickým chirurgickým výkonem, zejména protože na rozdíl od karcinomu prsu je karcinom ovarí obtížněji detekovatelný screeningem [200] a profylaktický výkon je též pro ženy celkově přijatelnější. Tento výkon je spojen s až 96% snížením rizika gynekologických karcinomů vzniklých na podkladě mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* a s až 50% redukcí rizika vzniku karcinomu prsu téže etiologie, což je vysvětlováno časným vyvoláním menopauzy.[201] Ke snížení rizika vede též antiestrogenní terapie (tamoxifenem), u níž dokonce bylo prokázáno až 40% snížení rizika vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*. [202, 203]

4.2.2.2. Klinické aspekty genetického genetického poradenství u pacientů s mutací v genech *BRCA1/2*

U pacientů s mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* může dojít ke změně léčebné strategie.[204] Při chirurgické intervenci je volen radikálnější přístup, tzn. většinou mastektomie namísto prs šetřícího výkonu, pacientce je též navržena možnost profylaktického kůži šetřícího výkonu na druhostranném prsu v jedné době. V rámci hormonální blokády je u nosiček mutací upřednostňována ovariectomie před farmakologickou blokádou, např. gonadotropiny uvolňujícími hormony (GnRH). Vzhledem k tomu, že karcinomy prsu spojené s mutací v genu *BRCA1* jsou často triple-negativní, je u nich často neúčinná hormonální i antiHER2/neu terapie. Z toho důvodu je základním léčebným postupem u této skupiny karcinomů chemoterapie.

Ve studiích *in vitro* i *in vivo* byla prokázána odlišná odpověď na cytostatika s různým mechanismem účinku. Cisplatina vykazovala zvýšený efekt u karcinomů prsu s deplecí proteinu BRCA1. [205] Důvodem zvýšení její účinnosti je pravděpodobně fakt, že vytváří vnitrořetězcové spoje („crosslinks“), pro jejichž opravu pomocí homologní rekombinace je nutný funkční protein BRCA1. Karcinomy související s mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* obecně též vykazují vyšší senzitivitu k účinku cytostatik, jejichž efekt je založen na vytváření dvouřetězcových zlomů, jako jsou ostatní platinové deriváty a antracykliny.

Naopak účinnost cytostatik, která jsou založena na poškození mikrotubulárních proteinů (taxany), je u pacientů s prokázanou mutací v genu *BRCA1* snižena. [206]

Patogenní mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* senzitivizují nádorové buňky k inhibici poly(ADP-riboza)polymerázy (PARP)¹. [207] Farmakologická inhibice tohoto enzymu vede v buňkách s nefunkční homologickou rekombinací, která je zapříčiněna deplecí proteinů *BRCA1* a *BRCA2*, k chromozomální nestabilitě, zástavě buněčného cyklu a apoptóze. Přesný mechanismus, jakým inhibitory PARP účinkují, není prozatím detailně popsán. [208] Klinické studie s inhibitory PARP přinášejí povzbudivé výsledky, avšak limitujícím faktorem zůstává, stejně jako u mnoha ostatních cílených léčiv, vznik rezistence nádorových buněk k terapii. [209] Slibné výsledky též přinášejí nedávné pokusy ovlivnit tumory nesoucí mutaci v genu *BRCA1* na úrovni RNA interference. [210, 211]

Další změny se týkají sekundární prevence vzniku dalších malignit, která zahrnuje častější pravidelné kontroly klinickým onkologem a dermatologem, kontrolní vyšetření prsu² (kombinace ultrazvukového vyšetření, mamografie a nukleární magnetické rezonance) a další možnosti, které se shodují s preventivními opatřeními pro zdravé nosičky uvedenými výše.

4.2.3. Etické aspekty genetického poradenství

Genetické vyšetření může souviset s řadou etických a psychosociálních aspektů, jako je strach z nádorového onemocnění u nosičů, otázka rodičovství a prenatální diagnostiky či genetická diskriminace nosičů mutací (ze strany pojišťoven či zaměstnavatele) [212]. V tomto kontextu se jako značně problematický jeví současný trend rozšiřování spektra testovaných genů na komerční úrovni. Se zavedením metod paralelního sekvenování se dramaticky zvýšila dostupnost testování nejen predispozičních genů se střední a nízkou penetrancí, ale také suspektních genů či polymorfismů. K jejich řádné klinické interpretaci však většinou chybí data. [213, 214]

4.2.4. Preventivní onkologická ambulance Onkologické kliniky 1. LF UK a VFN

Preventivní onkologická ambulance Onkologické kliniky 1. LF UK a VFN zajišťuje preventivní péči pro osoby se zvýšeným rizikem karcinomu prsu, karcinomu vaječníků a dalších malignit. U žen, jež jsou nosičkami zárodečné mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2*, provádí specializovanou dispenzární péči. Dále sleduje zdravé jedince, kteří jsou nosiči mutací v genech s nízkou a střední penetrancí (*PALB2*, *CHEK2*, *ATM*, *NBN*).

¹ Enzym PARP se v buňkách účastní reparace jednořetězcových zlomů DNA.

² Frekvence jednotlivých vyšetření je předmětem odborné diskuze.

Tato ambulance je v provozu od roku 2005 a v současné době má v péči 285 rodin s prokázanou hereditární predispozicí ke vzniku karcinomu prsu a vaječnicků. Celkově sleduje více než 500 osob s hereditární predispozicí ke vzniku karcinomu prsu a vaječnicků.

II. PRACOVNÍ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Předkládaná práce se zabývá výskytem a významem rekurentních mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* a v genu *NBN* ve vybraných populacích v České republice. Zahrnuje několik dílčích cílů:

1. stanovit frekvenci rekurentních mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* v neselektovaném souboru pacientek s karcinomem prsu
2. zhodnotit efektivnost v současnosti používaných indikačních kritérií ke genetickému vyšetření pacientek s vysokým rizikem hereditárního výskytu karcinomu prsu a/nebo ovarií
3. stanovit frekvenci nejčastějších patogenních mutací genu *NBN* ve vybraných populacích v České republice
4. na základě získaných výsledků eventuálně navrhnout rozšíření spektra testovaných genů u pacientek s vysokým rizikem hereditárního výskytu karcinomu prsu a/nebo ovarií o gen *NBN*
5. kategorizovat pacienty s vysokým rizikem hereditárního výskytu karcinomu prsu a/nebo ovarií do multifunkční databáze použitelné i pro další analýzy

III. MATERIÁL A METODY

1. Pacienti

1.1. Soubor pacientů testovaných na mutace v *BRCA1/2*

Vzorky pro genetické testování byly shromážděovány od pacientek s diagnózou primárního invazivního karcinomu prsu, které se od září roku 2004 do prosince roku 2006 léčily na Onkologické klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakulní nemocnice v Praze či na Oddělení klinické onkologie Ústřední vojenské nemocnice v Praze. Celkem 679 vzorků bylo konsekutivně odebíráno tak, jak byly pacientky na obou pracovištích postupně přijímány do péče. V návaznosti na histopatologické potvrzení diagnózy byly pacientky zařazovány do databáze bez ohledu na věk v době diagnózy, rodinnou anamnézu či výskyt jiných rizikových faktorů predisponujících k nosičství zárodečné mutace ve sledovaných genech. Informace týkající se osobní a rodinné anamnézy pacientek a ostatní klinická data byly převzaty z jejich lékařské dokumentace. Pro potřeby výzkumu byla odebrána konkrétně tato anamnestická data: věk v době diagnózy, klinické stádium onemocnění podle TNM klasifikace, bilaterální karcinom prsu či jiné nádorové onemocnění v osobní anamnéze a rodinná anamnéza výskytu nádorových onemocnění zahrnující příbuzné prvního a druhého stupně. Dále byly zaznamenávány tyto histopatologické charakteristiky: histopatologický typ karcinomu, exprese estrogenových, progesteronových a HER2/neu receptorů a grading karcinomu. Všechny zúčastněné pacientky byly české národnosti a trvalé bydliště měly v Praze a okolí.

730 kontrolních vzorků pocházelo od zdravých dárců krve, kteří v období od dubna 2004 do listopadu 2006 navštívili Transfuzní oddělení Thomayerovy nemocnice v Praze. Skupina kontrol byla vybrána randomově, bez ohledu na věk či pohlaví. Všichni participanti podepsali před odběrem genetického materiálu informovaný souhlas s testováním. Výzkum byl schválen Etickou komisí 1. lékařské fakulty a Všeobecné fakulní nemocnice v Praze.

1.2. Soubor pacientů testovaných na mutace v genu *NBN*

Vzorky pro analýzu byly získány od tří skupin osob. První skupinu tvořilo 600 vysoce rizikových pacientů s histopatologicky potvrzenou diagnózou karcinomu prsu nebo ovaria, kteří byli na základě kritérií pro testování genů *BRCA1/2* (dle směrnice České onkologické společnosti a Společnosti lékařské genetiky [181, 183], tabulka č. 12) v letech 2002-2009 indikováni ke genetickému vyšetření lékaři Ústavu biologie a lékařské genetiky, Preventivní onkologické ambulance Onkologické kliniky či Gynekologicko-porodnické kliniky

1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Jednalo se o pacienty, u kterých v rámci rutinního genetického vyšetření nebyla prokázána přítomnost bodových mutací, krátkých delecí či inzercí [133], rozsáhlých delecí a přestaveb genů *BRCA1* a *BRCA2* [26] či alterací v dalších predispozičních genech (*TP53*, *CHEK2* [26, 215] a *ATM* [160]).

Druhá skupina testovaných vzorků zahrnovala 703 neselektovaných pacientek s diagnózou primárního invazivního karcinomu prsu, které se od září roku 2004 do prosince roku 2006 léčily na Onkologické klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze či na Oddělení klinické onkologie Ústřední vojenské nemocnice v Praze. Vzorky byly odebírány konsektivně tak, jak byly pacientky na obou pracovištích postupně přijímány do péče. Pacientky byly do databáze zařazovány bez ohledu na věk v době diagnózy, rodinnou anamnézu či výskyt jiných rizikových faktorů predisponujících k nosičství zárodečné mutace ve sledovaných genech. Informace týkající se osobní a rodinné anamnézy pacientek a ostatní klinická data byly převzaty z jejich lékařské dokumentace.

Třetí skupina obsahovala 915 kontrolních vzorků od dárců krve z Prahy a okolí, kteří v období od dubna 2004 do května 2007 navštívili Transfuzní oddělení Thomayerovy fakultní nemocnice v Praze. Skupina kontrol byla vybrána randomově, bez ohledu na věk či pohlaví.

Pacienti ze všech tří skupin byli české národnosti, až na výjimky měli trvalé bydliště v Praze a v jejím okolí a před odběrem genetického materiálu podepsali informovaný souhlas s testováním. Výzkum byl schválen Etickou komisí 1. lékařské fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

2. Izolace genetického materiálu

Od každého pacienta bylo na výše uvedených pracovištích odebráno cca 10 ml periferní krve do zkumavek s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA) určených pro izolaci genetického materiálu.

2.1. Izolace DNA z periferní krve

DNA byla izolována z plné periferní žilní krve pomocí Wizard Genomic DNA Purification System (Promega, USA) podle instrukcí výrobce.

2.2. Kontrola koncentrace izolovaného genetického materiálu

Koncentrace a čistota izolovaného genetického materiálu (DNA) byla ověřována nejprve pomocí měření absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm s korekcí na 320 nm

na spektrofotometru LAMBDA Bio (PerkinElmer, Massachusetts, USA) a později na přístroji 33 Nanodrop (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

2.3. Design primérů

Pro amplifikaci byly navrženy primérové páry o délce cca 20 nukleotidů tak, aby měly v páru přibližně shodné teploty tání. Pro přibližný výpočet T_m oligonukleotidů byl použit vztah: $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$. Priméry byly designovány za pomoci softwaru AnnHyb v.4.936 (<http://bioinformatics.org/annhyb>), který byl mj. využit k optimalizaci jejich dalších charakteristik, např. k vyloučení vzájemné komplementarity za účelem eliminace tvorby dimerů.

3. Testování rekurentních mutací v testovaných genech

Panel testovaných mutací byl navržen tak, aby obsahoval všechny rekurentní mutace v genu *BRCA1* dříve identifikované v populacích pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu/a nebo ovarií v České republice. [132, 133, 216] Na základě zjištěných dat byly vytipovány mutace 5382insC a 300 T>G, které spolu s mutacemi vedoucími ke zkrácení proteinu („truncating“ mutace) v exonu 11 zahrnovaly více než 90 % dříve zachycených mutací. Obdobně byl v genu *BRCA2* vytipován 230 bp dlouhý úsek exonu 11, kde byly zachyceny rekurentní mutace 5873C>A, 5910C>G a 5991insT, které reprezentovaly téměř 40 % patogenních mutací dříve nalezených v tomto genu.[133] Metodika prescreeningu rekurentních mutací byla vybrána tak, aby splňovala doporučení pro prescreening mutací v genech *BRCA 1* a *BRCA 2* podle SLG [184] i EMQN [185].

V genu *NBN* byla testovaná oblast zvolena tak, aby zahrnovala nejčastější patologické mutace v exonu 6 spojované s výskytem familiárního karcinomu prsu – 657del5 a R215W.[163, 217]

3.1. Prescreening rekurentních mutací v genu *BRCA1*

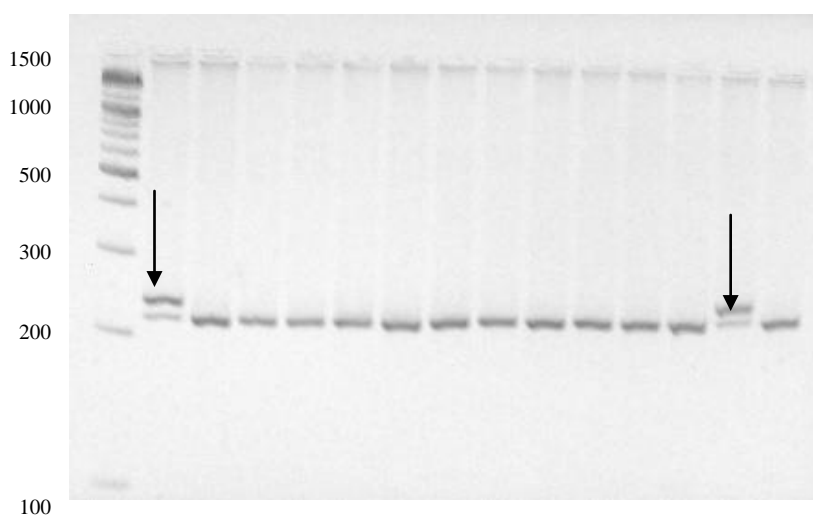
3.1.1. Prescreening rekurentní mutace 5382insC

Mutace 5382incC ve 20. exonu genu *BRCA1* byla detekována pomocí tzv. „mismatched“ polymerázové reakce kombinované s analýzou délkového polymorfismu restrikčních fragmentů („restriction fragment length polymorphism“, RFLP). Amplifikace 234 bp dlouhého fragmentu exonu 20, který obsahoval místo mutace 5382incC, byla prováděna pomocí primérů uvedených v tabulce č. 13. Polymerázová řetězová reakce probíhala v 12,5 µl reakční směsi, která obsahovala 1x PCR pufr (10 mM tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM všech dNTP, 0,4 µM obou primerů, 0,5 jednotky TaqDNA polymerázy

(Takara Shuzo Co., Japonsko) a 50-100ng genomové DNA. Po úvodní denaturaci, která trvala 3 minuty při teplotě 94°C, proběhlo 32 amplifikačních cyklů složených z denaturace při 94°C po 30 sekund, nasednutí primerů („annealing“) při 61°C po 30 sekund a prodloužování při 72°C po 2 minuty. Závěrečné prodloužení při 72°C probíhalo 5 min. U vzorku bez mutace 5382incC vede reakce ke vzniku nového restrikčního místa pro restrikční endonukleázu DdeI, která vzniklý produkt štěpí na dva fragmenty o velikosti 214 bp a 20 bp. Přítomnost mutace 5382incC ve vyšetřovaném vzorku nevede při amplifikaci ke vzniku restrikčního místa a produkt o velikosti 234 bp není restrikční endonukleázou DdeI štěpen. Produkty reakce byly rozděleny s použitím předpřipravených spreadexových gelů EL 300 elektroforézou (SEA 2000, Elchrom Scientific AG, Cham, Švýcarsko) a vizualizovány barvou SYBR Gold Nucleic Acid Gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) dle pokynů výrobce (obrázek č. 16).

Gen <i>BRCA1</i>			
Název	Sekvence (5' - 3')	Exon	Délka amplikonu
BR20f	CCAAAGCGAGCAAGAGAATCTC	20	234 bp
BR20r	GGGAATCCAATTACACAGC	20	234 bp

Tabulka 13: Priméry použité pro prescreening rekurentní mutace 5382insC v genu *BRCA1*



Obrázek 16: Elektroforéza znázorňující dělení PCR produktů vzniklých štěpením restrikční endonukleázou DdeI. Šipky ukazují pozitivní kontrolu (vlevo) a pozitivně testovaný vzorek (vpravo).

3.1.2. Prescreening rekurentní mutace 300T>G

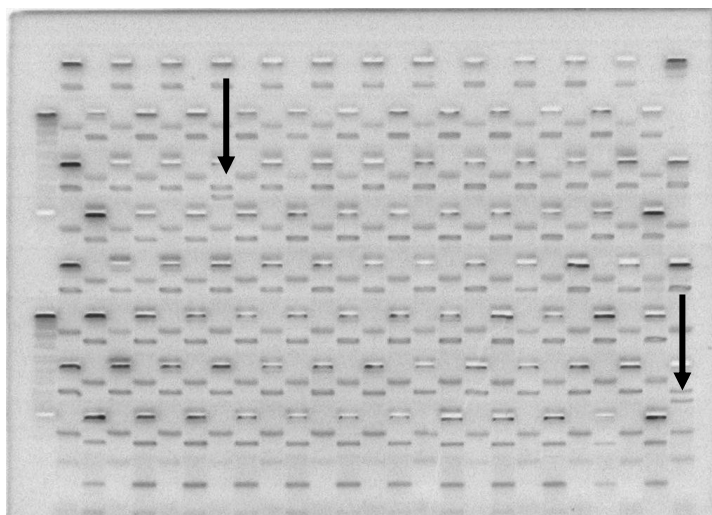
Mutace 300T>G v 5. exonu genu *BRCA1* byla detekována pomocí analýzy délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP). Amplifikace 330 bp dlouhého fragmentu exonu 5, který obsahoval místo mutace 300T>G, probíhala pomocí primerů uvedených v tabulce č. 14. v 10 µl reakční směsi obsahující 1 µl 10 x PCR pufru (Roche, Mannheim,

Německo), 0,2 mM všech dNTP, 0,4 μ M obou primerů a 0,5 jednotky polymerázy Fast Start TaqDNA (Roche) a 50-100 ng genomové DNA. Po úvodní denaturaci, která trvala 3 minuty při teplotě 95°C, proběhlo 35 cyklů složených z denaturace při 95°C po 30 sekund, nasedání primerů („annealing“) při 58°C po 30 sekund a prodlužování při 72°C po 2 minuty. Závěrečné prodloužení při 72°C probíhalo 7 min.

U vzniklých DNA fragmentů, které nenesly mutaci 300T>G, bylo přítomno pouze jedno restrikční místo pro restrikční endonukleázu Cfr13I (Fermentas, St. Leon Rot, Německo) a tyto fragmenty byly působením endonukleázy rozštěpeny na dva menší fragmenty o velikosti 144 bp a 186 bp. V DNA fragmentech nesoucích mutaci 300T>G vytváří záměna báze druhé restrikční místo pro endonukleázu Cfr13I, která tyto fragmenty dělí do tří menších o velikosti 144 bp, 174 bp a 12 bp. Vzniklé produkty štěpení byly dále rozděleny s použitím předpřipravených spreadexových gelů EL 300 elektroforézou (SEA 2000, ElchromScientific AG, Cham, Švýcarsko) (obrázek č. 17) a vizualizovány barvou SYBR Gold Nucleic Acid Gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) dle pokynů výrobce.

Gen <i>BRCA1</i>			
Název	Sekvence (5' - 3')	Exon	Délka amplikonu
BR6f	CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG	5	330 bp
BR6r	TTGGAAATAATTTACTGTGTGC	5	330 bp

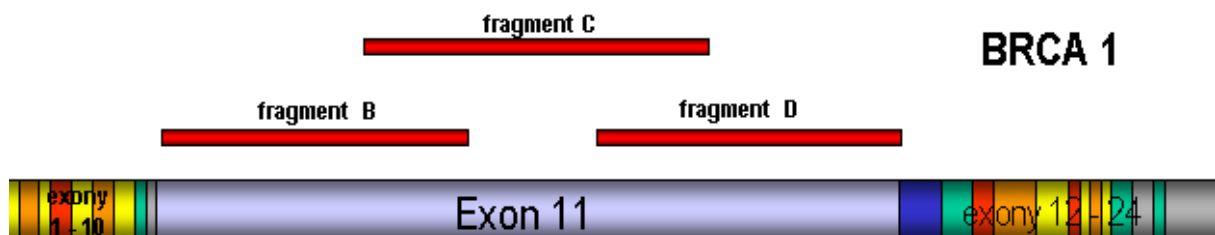
Tabulka 14: Priméry použité pro prescreening rekurentní mutace 300T>G v genu *BRCA1*



Obrázek 17: Znázornění spreadexových gelů při dělení štěpného produktu vzniklého působením Cfr13I. Šipky ukazují pozitivní kontrolu a pozitivně testovaný vzorek.

3.1.3. Prescreening mutací v exonu 11

Zkracující mutace v exonu 11 genu *BRCA1* byly detekovány za pomoci tzv. testu zkrácení proteinu („protein truncation test“, PTT) (obrázek č. 19). Amplifikace jednotlivých fragmentů exonu 11 (obrázek č.18) probíhala v 12,5 µl reakční směsi, která obsahovala 1x PCR pufr (10 mM tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM obou odpovídajících primérů (tabulka č. 15), 0,5 jednotky LA Taq DNA polymerázy (Takara Shuzo Co., Japonsko) a 50-100 ng genomické DNA. Po 2 minutách iniciační denaturace při 93°C následovalo 32 cyklů amplifikační cyklů, které se skládaly z denaturace při 93°C po dobu 1 minuty, nasedání primérů („annealing“) při 58°C po dobu 1 minuty a prodlužování při 72°C po dobu 2 minut. Závěrečné prodlužování při teplotě 72°C trvalo 5 minut. 0,8 µl nasyntetizovaného PCR produktu bylo inkubováno 90 minut při teplotě 30°C ve směsi 1,0 µCi L-[³⁵S]-methioninu (Amersham Biosciences, Velká Británie) a 1,2 µl lyzátu králíčích retikulocytů (TnT/T7 Coupled Transcription/Translation Systém – Promega, USA). Vzniklé proteinové produkty byly poté 1 hodinu děleny elektroforézou při 200 W za přítomnosti SDS (Bio-Rad Laboratories, USA) na 12% polyakrylamidových gelech, které byly následně 20 minut fixovány v roztoku 40% methanolu a 10% kyseliny octové. Poté byly gely 20 minut inkubovány ve fluorescenčním roztoku Amplify (Amersham Biosciences, Velká Británie). Po usušení ve vakuu byly gely exponovány 48 hodin na rentgenový film při teplotě -80°C. Délky jednotlivých fragmentů byly odečítány podle velikostního standardu Pre-stained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad Laboratories, USA). Za přítomnosti mutace v 11 exonu genu *BRCA1* vykazoval vzorek abnormální obraz – místo proteinového produktu očekávané délky se objevil kratší produkt.

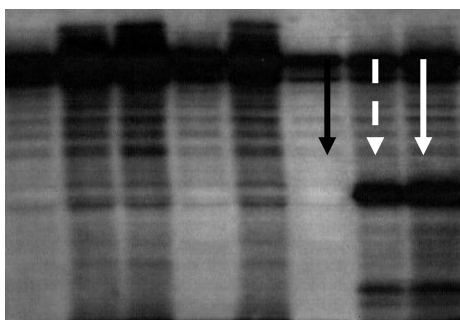


Obrázek 18: Schematické znázornění fragmentů použitých při PTT v exonu 11 genu *BRCA1*

Gen <i>BRCA1</i>				
Název	Sekvence (5' - 3')	Exon	Fragment	Délka amplikonu
BR11f1	T7 ¹ -CTTGTGAATTTTCTGAGACGG	11	fragment B	1333 bp
BR11r1	ATGAGTTGTAGTTTCTGCTGTG	11	fragment B	1333 bp
BR11f2	T7-ACAATTCAAAAGCACCTAAAAAG	11	fragment C	1463 bp
BR11r2	AACCCCTAATCTAAGCATAGCATTTC	11	fragment C	1463 bp
BR11f3	T7-CACCACTTTTCCCATCAAGTC	11	fragment D	1123 bp
BR11r3	TTATTTTCTCCAAGCCCGTTCC	11	fragment D	1123 bp

¹ Prodloužující sekvence, bez níž není v průběhu PTT možná transkripce ani translace *in vitro*. Obsahuje transkripční iniciační sekvenci fága T7, vazebnou ribozomální sekvenci a iniciační eukaryotní kodon.

Tabulka 15: Priméry použité pro prescreening rekurentních mutací v exonu 11 genu *BRCA1*



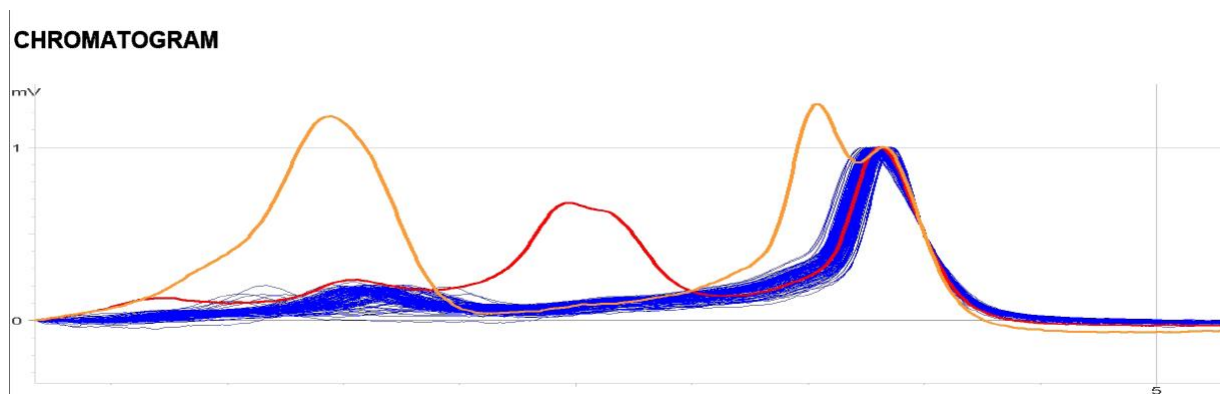
Obrázek 19: PTT fragmentu B. Černá šipka označuje vzorek bez mutace, bílá přerušovaná šipka mutaci a bílá nepřerušovaná označuje pozitivní kontrolu.

3.2. Prescreening rekurentních mutací v genu *BRCA2*

Rekurentní mutace v genu *BRCA2* byly stanovovány ve 230 bp dlouhém fragmentu 11. exonu metodou denaturační vysokoúčinné kapalinové chromatografie („denaturing high-performance liquid chromatography“; DHPLC). Amplifikace fragmentu byla provedena v 15 µl reakční směsi, která obsahovala 1,5 µl 10x PCR pufru, 0,2 mM všech dNTP, 0,4 µM obou primérů (tabulka č. 16), 0,6 jednotky DNA polymerázy GoldTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 100 ng genomové DNA. Po úvodní denaturaci, která trvala 10 minut při teplotě 95°C, následně proběhlo prvních 10 cyklů složených z denaturace při 95°C po 30 sekund, teplota však při nasedání primerů klesala vždy o 1 °C / cyklus z 65°C na 55 °C po 30 sekund, a z prodlužování při 72°C po 2 minuty. Na těchto úvodních 10 cyklů navazovalo 25 cyklů složených z denaturace při 95°C po 30 sekund, nasedání primerů při 55°C po 30 sekund a prodlužování při 72°C vždy 2 minuty. Závěrečné prodlužování probíhalo při 72°C celkem 7 minut. 5 µl vzniklého PCR produktu bylo analyzováno denaturační vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (WAVE 3500 System Transgenomic, Omaha, NE) (obrázek č. 20) s použitím „DNASep cartridge“ při 55°C za stoupajícího gradientu (58–67%) acetonitrilu v pufru B.

Gen <i>BRCA2</i>			
Název	Sekvence (5' - 3')	Exon	Délka amplikonu
BR2_11f	CGTTTGTGTTTCACATGAAAC	11	230 bp
BR2_11r	CTTCACTCTGAATGTCAGCA	11	230 bp

Tabulka 16: Priméry použité pro prescreening rekurentních mutací ve fragmentu exonu 11 genu *BRCA2*



Obrázek 20: Obráz sledovaných mutací při analýze denaturační vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Červeně je znázorněna mutace 5873C>A, žlutě pak mutace 5991insT.

4. Prescreening mutací v genu *NBN*

V genu *NBN* byla pro prescreening sledovaných mutací použita vysokorozlišovací analýza křivek tání („high-resolution melting analysis“, HRMA) fragmentu dlouhého 293 bp, který zaujímal exon 6 s přilehlými intronovými oblastmi.

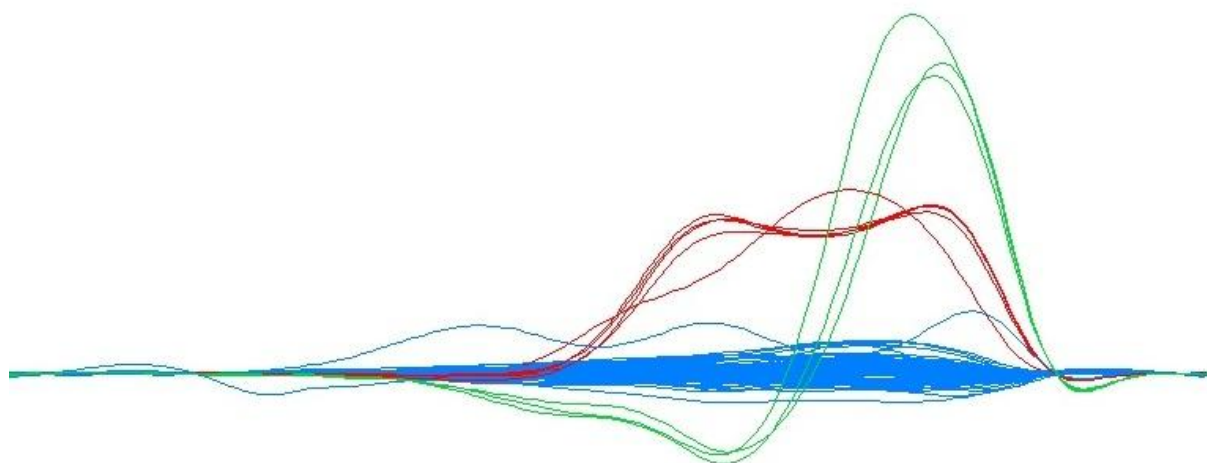
Amplifikace fragmentu byla provedena v 10 μ l reakční směsi, jež obsahovala 5 μ l 1 \times LightCycler® 480 High Resolution Melting Master Mix (Roche Applied Science), 0,2 μ l 20pmol roztoku primérů (uvedených v tabulce č. 17), 1,2 μ l 25mM MgCl₂, 2,9 μ l H₂O a cca 50 ng genomové DNA v 0,5 μ l za použití přístroje Light Cycler 480 (Roche). Program se skládal z úvodní 10minutové denaturace při 95°C, následně proběhlo 45 amplifikačních cyklů složených z denaturace při 95°C po 10 sekund, nasedání primérů při 60°C po 15 sekund a prodlužování při 72°C po 15 sekund. Po amplifikaci proběhla denaturace vzniklých produktů při 95°C po dobu jedné minuty a poté ochlazení na 40°C opět po 1 minutu. Poté byla teplota skokově zvýšena na 60°C a následně vzrůstala rychlostí 0,02 °C/sekundu do 95°C s kontinuálním zaznamenáváním hodnot fluorescence (25x/1 °C).

Analýza křivek tání byla provedena za použití LightCycler® 480 Gene Scanning softwaru (Roche Applied Science). Vzorky s aberantní křivkou tání nebo detekovaným „peakem“

v grafu negativní první derivace fluorescence proti teplotě tání (obrázek č. 21) byly dále určovány přímou sekvenací.

Gen <i>NBN</i>			
Název	Sekvence (5' - 3')	Exon	Délka amplikonu
BR2_11f	CAGATAGTCACTCCGTTTACAA	6	293 bp
BR2_11r	GTTGTTAACGTATTTTCATTTTGGG	6	293 bp

Tabulka 17: Priméry použité pro prescreening mutací v exonu 6 genu *NBN*

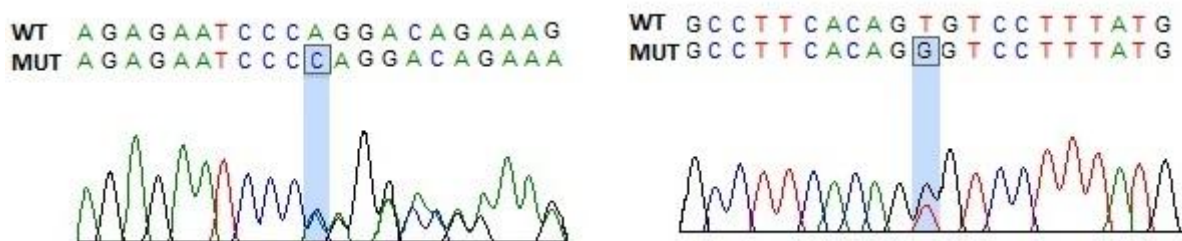


Obrázek 21: Obráz sledovaných mutací – negativní první derivace křivek tání při vysokorozlišovací analýze křivek tání (HRMA)

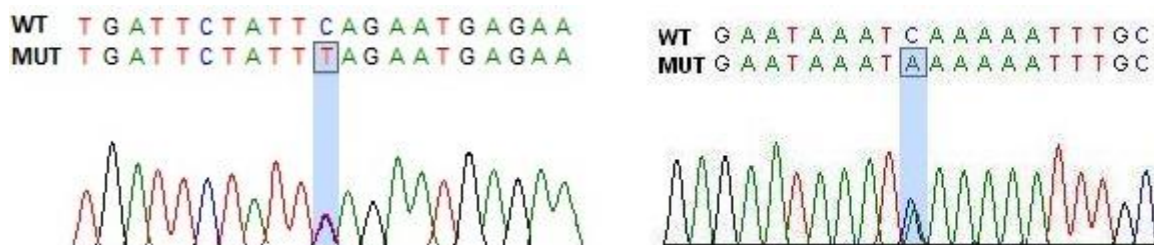
5. Potvrzení a charakterizace nalezených mutací přímým sekvenováním

V souladu s doporučením SLG [184] i EMQN [185] byly všechny aberantní vzorky z výše uvedených prescreeningových metod vyšetřeny přímou sekvenací z nově amplifikovaného vzorku (obrázek č. 22, 23 a 24). Amplifikace alikvótního vzorku probíhala podle protokolu popsaného výše. Vzniklý PCR produkt byl purifikován s použitím kolon obsahujících DNA vázající pryskyřici (Qiagen, Německo), dle doporučení výrobce, a následně elulován ddH₂O do objemu 25 µl. Množství purifikátu užitého v sekvenační reakci bylo přímo úměrné kvalitě primárního PCR produktu - většinou 2,85 µl. Sekvenační reakce probíhala v reakční směsi o celkovém objemu 5 µl obsahující 2 µl reagentie BigDye 3.1 (polymeráza, dNTPs, MgCl₂ - Applied Biosystems, USA), 6 pmolů sekvenačního priméru, příslušný objem purifikátu PCR produktu a H₂O. Reakce probíhala ve 20 cyklech. Po úvodní denaturaci při 95°C po dobu 2 minut se opakovala denaturace 95°C po dobu 5 sekund, nasedání primérů při 60°C po dobu 10 sekund a prodlužování při 72°C po dobu 4 minut. Před samotnou kapilárovou elektroforézou na automatickém sekvenátoru byly produkty sekvenační reakce nejprve

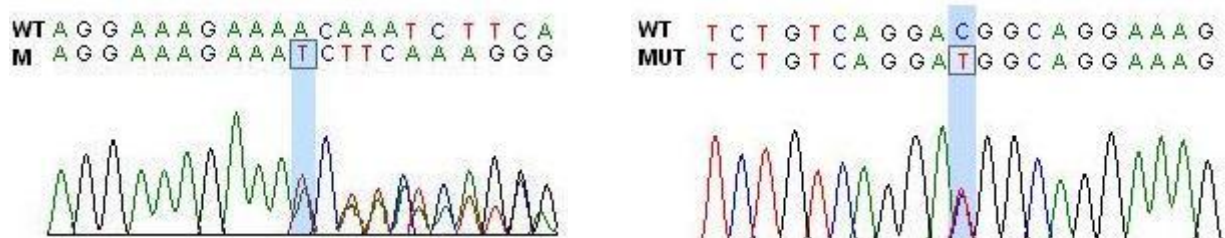
precipitovány 15 minut při pokojové teplotě v 60 μ l směsi obsahující 0,1 M acetát sodný, 4 mM EDTA, pH 8,0 a 80% ethanol. Po centrifugaci (14 000 rpm, 20 min, 4°C) byl supernatant opatrně odsán, k precipitátu bylo přidáno 70 μ l 70% ethanolu a zkumavka byla opět centrifugována za stejných podmínek. Po centrifugaci byl supernatant znovu opatrně odsán. Poté byla zkumavka sušena po dobu 1 minuty při 90°C. Precipitát DNA byl následně rozpuštěn v HiDi formamidu a roztok denaturován po dobu 2 minut při teplotě 95°C a následně ihned schlazen na 4°C. Takto připravený vzorek byl analyzován za denaturujících podmínek ve 36 cm kapiláře na polymeru POP-7 za použití automatického sekvenátoru ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, USA) dle pokynů výrobce a s příslušným softwarovým zpracováním.



Obrázek 22: Potvrzení mutací v genu *BRCA1* sekvenováním, vlevo 5382insC v exonu 20 a vpravo 300T>G v exonu 5.



Obrázek 23: Potvrzení mutací 1806C>T v exonu 11 genu *BRCA1* (vlevo) a 5873C>A v exonu 11 genu *BRCA2*



Obrázek 24: Potvrzení mutací v genu *NBN* sekvenováním. Vlevo 657del5, vpravo c.643C>T (R215W) v exonu 6

Statistické zpracování

Statistická analýza byla provedena s užitím softwaru CRAN 2.4.0 a programu STATISTICA 98Edition. Pro měřené parametry byly v celých souborech a v jednotlivých skupinách vypočítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, rozptyl, medián, mezikvartilové rozpětí, minimum, maximum a 95% konfidenční intervaly. U kategorických proměnných byly zkoumány jejich frekvence a byly taktéž počítány 95% konfidenční intervaly výskytu daného jevu ve zkoumaných skupinách. Na porovnání distribucí jednotlivých parametrů v různých skupinách byla použita klasická analýza rozptylu („Analysis of variance“, ANOVA) a dvouvýběrový neparametrický Wilcoxonův test.

Pro zjištění závislosti zkoumaných znaků, vzhledem k negausovskému rozdělení těchto proměnných, byl použit Spearmanův koeficient korelace. Shoda relativních četností výskytu zkoumaných znaků mezi danými skupinami byla analyzována užitím tzv. testu o shodě relativních četností a taktéž pomocí „chi-kvadrát“ („chi-square“) testu.

IV. VÝSLEDKY

1. Specifika vyšetřovaných skupin

1.1. *BRCA1* a *BRCA2*

Mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* byly vyšetřovány celkem na 1409 vzorcích, z toho 679 pocházelo od konsekutivních neselektovaných pacientek s histopatologicky potvrzenou diagnózou primárního invazivního karcinomu prsu a 730 od kontrolních osob bez prokázaného nádorového onemocnění. Věk v době diagnózy byl znám u 651 pacientek. Medián věku v době diagnózy byl 56 let. Zatímco věk 207 (32 %) pacientek nepřesáhl v době diagnózy 50 let, 444 (68 %) pacientek bylo v době diagnózy starších než 50 let. Rodinnou anamnézu bylo možné detailně popsat u 606 pacientek. 81 (13 %) z nich uvedlo výskyt karcinomu prsu mezi příbuznými v první či druhé linii. Ovariální karcinom mezi příbuznými v první či druhé linii byl zaznamenán u 12 (2 %) z nich. Bilaterální karcinom prsu byl diagnostikován u 13 (2 %) ze všech 679 pacientek. Histopatologický typ karcinomu byl evidován u 574 pacientek, z toho ve 411 (72 %) případech se jednalo o invazivní duktální karcinom (IDC), v 81 (14 %) případech o invazivní lobulární karcinom (ILC), v 19 (3 %) případech o invazivní medulární karcinom a v 63 (11 %) případech se jednalo o ostatní typy invazivních karcinomů. Expresi estrogenových receptorů bylo možné posoudit u 487 pacientek. U 383 (79 %) z nich byla identifikována pozitivita estrogenových receptorů, zatímco ve zbylých 104 (21 %) případech nebyla exprese estrogenových receptorů přítomna. U 400 pacientek bylo možné stanovit expresi progesteronových receptorů, z toho ve 256 (64 %) případech byla zaznamenána pozitivita progesteronových receptorů a ve 144 (36 %) případech byla exprese progesteronových receptorů negativní. Triple-negativní karcinom prsu byl doložen v 18 (4 %) případech ze 462 pacientek.

1.2. *NBN*

Mutace v genu *NBN* byly vyšetřovány celkem na 2218 vzorcích, z toho 600 pocházelo od pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovarií, u nichž byla histopatologicky potvrzena diagnóza karcinomu prsu a/nebo ovaria, 703 od konsekutivních neselektovaných pacientek s histopatologicky potvrzenou diagnózou primárního invazivního karcinomu prsu a 915 od kontrolních osob bez prokázaného nádorového onemocnění. Skupina 600 pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovarií, u nichž byla histopatologicky potvrzena diagnóza karcinomu prsu a/nebo ovaria, negativně testovaných na přítomnost mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*, zahrnovala 285 pacientů indikovaných ke genetickému vyšetření na základě pozitivní rodinné anamnézy karcinomu

prsu či ovariálního karcinomu a 315 případů bez pozitivní rodinné anamnézy, u nichž bylo genetické vyšetření indikováno na základě dalších rizikových faktorů dle indikačních kritérií [183], [181], tabulka č. 12. Skupina pacientů vyšetřovaných na základě pozitivní rodinné anamnézy (dle indikačních kritérií) zahrnovala 195 pacientů indikovaných ke genetickému vyšetření pro pozitivní rodinnou anamnézu výskytu toliko karcinomu prsu, 81 pacientů indikovaných pro pozitivní rodinnou anamnézu současného výskytu karcinomu prsu i karcinomu ovarií a 9 pacientů indikovaných pro pozitivní rodinnou anamnézu karcinomu jen ovarií. Skupina vysoce rizikových karcinomů prsu bez pozitivní rodinné anamnézy se skládala z 164 pacientek s karcinomem prsu diagnostikovaným do 35 let věku, 66 pacientek s karcinomem ovaria diagnostikovaným do 40 let věku, 25 pacientek s bilaterálním karcinomem (diagnóza prvního karcinomu do 50 let věku), 17 pacientek s duplicitním karcinomem prsu i ovarií, 18 pacientek s histologií medulárního či atypického medulárního karcinomu, 8 případů triple-negativních karcinomů prsu a ze 17 případů karcinomu prsu u mužů. Druhá skupina testovaných vzorků zahrnovala 703 neselektovaných pacientek s diagnózou primárního invazivního karcinomu prsu. Tato skupina byla totožná se souborem konsektivních neselektovaných pacientek popsanych v kapitole III. 1. 1. a IV. 1. 1. a byla doplněna o 24 pacientek, u nichž nebyly pro potřeby testování mutací v genu *NBN* zaznamenávány anamnestické údaje. Třetí skupina obsahovala 915 kontrolních vzorků od osob bez diagnostikovaného nádorového onemocnění. Tato skupina byla vybrána randomově, bez ohledu na věk či pohlaví testované osoby.

Pacienti ze všech skupin byli české národnosti a před odběrem genetického materiálu podepsali informovaný souhlas s testováním. Výzkum byl schválen Etickou komisí 1. lékařské fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

2. Zachycené rekurentní mutace

2.1. *BRCA1* a *BRCA2*

Ve skupině 679 konsektivních neselektovaných pacientek se sporadickým karcinomem prsu bylo zachyceno 16 patogenních zárodečných mutací (tabulka č. 18). Tzn. že 2,4 % (95% CI 1,2-3,5) všech vyšetřovaných sporadických případů primárního invazivního karcinomu bylo spojeno s alteracemi v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Zatímco v genu *BRCA1* bylo nalezeno 14 mutací (2,1%; 95% CI 0,9–3,1), v genu *BRCA2* byly identifikovány 2 (0,3%; 95% CI 0,0–0,7) mutace. Ve sledovaném souboru se nejčastěji vyskytovala mutace v genu *BRCA1* 5382insC, a to v 7 (1,0%) případech. Druhou nejfrekventnější zachycenou genovou alterací představovala mutace v genu *BRCA1* 300T>G, která byla v testované skupině identifikována

celkem 3krát (0,4%). Lokálně prevalentní mutace v genu *BRCA1* - 1806C>T a 3819del5 - a *BRCA2* - 5991insT a 5873C>T -, které byly již dříve popsány na našem pracovišti u skupiny pacientů indikovaných ke genetickému vyšetření [133], se v testovaném souboru vyskytovaly vždy v jednom případě (0.15%). Dvě mutace v genu *BRCA1* indentifikované každá u jedné pacientky ze zkoumané skupiny sporadických karcinomů, a to konkrétně 2607dup10 a 1135insA, nebyly dříve u vysoce rizikových pacientů vyšetřovaných na našem pracovišti zachyceny [133]. U 730 kontrolních vzorků, které byly vyšetřovány na přítomnost nejčastější mutace 5382insC a na přítomnost mutací v exonu 11 genu *BRCA1*, byla identifikována mutace 5382insC pouze v jednom případě, zatímco žádné mutace v exonu 11 genu *BRCA1* nebyly nalezeny.

Číslo pacienta	Exon	Název mutace dle c.DNA	Předpokládaný efekt mutace	Histopatologický typ	Věk v době diagnózy	Rodinná anamnéza nádorového onemocnění (věk v době diagnózy)
BRCA1						
196	20	5382insC	Gln1756fsX1829	lobulární	58	-
197	20	5382insC	Gln1756fsX1829	duktální	44	ca ovarií, M (50), ca ovarií, MM (50)
302	20	5382insC	Gln1756fsX1829	medulární	55	-
304	20	5382insC	Gln1756fsX1829	medulární	39	-
592	20	5382insC	Gln1756fsX1829	duktální	46	ca dělohy, M (?) ca ovarií, S (?)
639	20	5382insC	Gln1756fsX1829	duktální	61	ca plic, O (?)
689	20	5382insC	Gln1756fsX1829	duktální	50	-
278	5	300T>G	Cys61Gly	duktální	61	ca plic, M (57)
364	5	300T>G	Cys61Gly	mucinózní	47	-
365	5	300T>G	Cys61Gly	medulární	28	-
214	11	1135insA	Lys339fsX345	medulární/duktální	43/51	nádor CNS, O (?), ca prostaty, OM (?)
708	11	1806C>T	Gln563X	duktální	53	-
660	11	2607_2616dup10	Lys830fsX	duktální	50	-
331	11	3819del 5	Val1234fsX1241	duktální/duktální	51/53	-
BRCA2						
691	11	5873C>A	p.Ser1882X	duktální	67	ca dělohy, M (?)
542	11	5991insT	p.Ala1922fsX1923	lobulární	61	ca žaludku, M (62) ca plic, S (67)

Tabulka 18: Rekurentní mutace zachycené v genech *BRCA1* a *BRCA2*

2.2. *NBN*

Ve skupině 600 pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu, u nichž byla histopatologicky potvrzena diagnóza karcinomu prsu a/nebo ovaria, bylo ve sledovaném úseku exonu 6 zachyceno celkem 5 mutací (tabulka 19). 2 pacientky byly nosičkami mutace 657del5 (0,33 %) a vždy u jedné pacientky byla identifikována jedna z následujících mutací: R215W (0,17 %), V210F(c.628G>T) (0,17 %) a c.595C>T (0,17 %) (tabulka č.19). Ve skupině 703 konsekutivních neselektovaných pacientek s histopatologicky potvrzenou diagnózou primárního invazivního karcinomu prsu bylo nalezeno celkem 9 pacientek nesoucích mutaci ve sledovaném úseku exonu 6, z toho 2 pacientky s mutací 657del5 (0,28 %), 3 pacientky s mutací R215W (0,43 %), 2 pacientky s mutací V201F (0,28 %) a 1 pacientka s mutací c.596C>G (0,14 %) (tabulka č. 19) Ve skupině 915 kontrolních osob bez prokázaného nádorového onemocnění bylo identifikováno celkem 9 mutací, z toho 2 osoby nesly mutaci 657del5 (0,22 %), 4 osoby mutaci R215W (0,44 %), 2 osoby V210F (0,22 %) a 1 osoba nesla mutaci c.596C>T (0,11 %) (tabulka č.19) V intronových oblastech bylo zachyceno celkem 5 mutací. Jedna mutace c.585-4A>G (0,17 %) byla nalezena ve skupině pacientek s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu. 4 (0,44 %) další substituce byly identifikovány ve skupině kontrol: c.585-5T>C (0,11 %), c.702+9G>A (0,11 %) a ve dvou případech pak c.702+26C>G (0,22 %).

Název mutace dle cDNA	c.657_661del5	c.643C>T	c.628G>T	c.595C>T	c.596C>G
Předpokládaný efekt mutace	p.K219Nfs*16	p.R215W	p.V210F	p.P199S	p.P199R
Pacientky s vysokým rizikem (N=600)	2 (0,33 %)	1 (0,17 %)	1 (0,17 %)	1 (0,17 %)	0
Neselektované pacientky (N=703)	2 (0,28 %)	3 (0,43 %)	2 (0,28 %)	0	1 (0,14 %)
Kontrolní populace (N=915)	2 (0,22 %)	4 (0,44 %)	2 (0,22 %)	0	1 (0,11 %)

Tabulka 19: Mutace zachycené v genu *NBN*

3. Klinická a histopatologická charakteristika pacientek s mutací v genech *BRCA1/2*

Medián věku v době diagnózy byl u nosiček mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* nižší než u pacientek, u nichž mutace nebyly identifikovány, rozdíl však nedosáhl statistické signifikance (50,8 vs 56,0 let; p=0,06). Nicméně bylo prokázáno, že pacientky, u kterých byl karcinom prsu diagnostikován před 50. rokem života, měly více než dvounásobnou pravděpodobnost nosičství mutace oproti pacientkám, jimž bylo v době diagnózy 50 a více let. Ze 16 celkově zachycených případů nosiček patogenní mutace v genu *BRCA1* nebo *BRCA2* měly u příbuzných prvního či druhého stupně 2 pacientky pozitivní rodinnou

anamnézu ovariálního karcinomu (12,5 %) a jedna pacientka karcinomu prsu (6,25 %). Ve skupině pacientek bez prokázané zárodečné mutace v genu *BRCA1* či 2 byla rodinná anamnéza známá v 590 případech, z toho pozitivní rodinná anamnéza ovariálního karcinomu byla zaznamenána u 10 pacientek (1,7 %) a karcinomu prsu u 80 pacientek (13,6 %). V našem souboru testovaných pacientek se sporadickým karcinomem prsu pozitivní rodinná anamnéza ovariálního karcinomu u příbuzných prvního či druhého stupně významně zvyšuje pravděpodobnost nosičství zárodečné mutace v genu *BRCA1* nebo 2 (OR=8,3; 95% CI 1,7-41,4; p=0,01). Naproti tomu příbuzný prvního či druhého stupně, jemuž byl diagnostikován karcinom prsu, nezvyšoval u pacientek z našeho souboru riziko nosičství patogenní mutace v genech *BRCA1/2*. U 13 z 16 případů identifikovaných nosiček vůbec nebyla prokázána souvislost s rodinnou anamnézou karcinomu prsu či ovaria. Incidence bilaterálního karcinomu prsu byla u nosiček vrozené patogenní mutace v genu *BRCA1/2* signifikantně vyšší než u pacientek bez prokázané mutace (2/16 vs 11/663, tj. 12,5 % vs 1,7 %; OR=7,5; 95% CI 1,5-37,3; p=0,01). Výsledek histopatologického vyšetření byl dostupný u všech identifikovaných nosiček a u 558 pacientek bez prokázané mutace. Indtraduktální karcinom převažoval v obou skupinách, zatímco histopatologický typ medulárního karcinomu byl signifikantně častěji spojen s nosičstvím patogenní mutace v genu *BRCA1/2* (4/12 vs 15/558, tj. 25 % vs 2,7 %; OR=12,1; 95% CI 3,5-41,8; p=0,0001). Mezi oběma skupinami nebyly zaznamenány významné rozdíly v nádorovém gradu ani v klinickém stádiu onemocnění. Karcinomy nosiček mutací signifikantně častěji vykazovaly negativitu exprese progesteronových receptorů (11/16 vs 133/384, tj. 68,8 % vs 34,6 %; OR=4,2; 95% CI 1,4-12,2; p=0,01), zatímco pozitivita exprese estrogenových receptorů se v obou sledovaných skupinách významněji nelišila. U nosiček mutací v genech *BRCA1/2* byl častěji než u pacientek bez prokázané zárodečné mutace zaznamenán triple-negativní typ karcinomu, ale výsledky nedosáhly statistické signifikance (2/16 vs 16/446, tj. 12,5 % vs 3,6 %; OR=3,8; 95% CI 0,8-18,3; p=0,09). Klinické charakteristiky nosiček mutací v genu *BRCA1* a *BRCA2* a pacientek bez zachycené mutace porovnává tabulka č. 20.

	Nosiči mutace v <i>BRCA 1/2</i> (%)	Pacientky bez mutace (%)	OR ¹	CI 95%	hodnota p
Věk v době diagnózy (n= 651) ²					
≤ 50 let	8 (50,0)	199 (31,3)	2,2	0,8 – 5,9	0,1
> 50 let	8 (50,0)	436 (68,7)	0,5	0,2 – 1,2	0,1
Rodinná anamnéza (n= 606)					
karcinomu prsu	1 (6,3)	80 (13,6)	0,4	0,1 – 3,3	0,4
karcinomu ovarií	2 (12,5)	10 (1,7)	8,3	1,7 – 41,4	0,01
Bilaterální karcinom prsu (n=679)					
	2 (12,5)	11 (1,7)	7,5	1,5 – 37,3	0,01
Histopatologický typ (n= 574)					
invazivní duktální	8 (50,0)	403 (72,2)	0,4	0,1 – 1,0	0,06
invazivní lobulární	2 (12,5)	79 (14,2)	0,9	0,2 – 3,9	0,8
invazivní medulární	4 (25,0)	15 (2,7)	12,1	3,5 – 41,8	0,0001
ostatní typy	2 (12,5)	61 (10,9)	1,2	0,3 – 5,2	0,8
Stav ER (n= 487)					
ER pozitivní	12 (75,0)	371 (78,8)	0,8	0,3 – 2,6	0,7
ER negativní	4 (25,0)	100 (21,2)	1,2	0,4 – 3,9	0,7
Stav PR (n= 400)					
PR pozitivní	5 (31,25)	251 (65,4)	0,2	0,1 – 0,7	0,01
PR negativní	11 (68,75)	133 (34,6)	4,2	1,4 – 12,2	0,01
Triple-negativní tumory (n=462)					
	2 (12,5)	16 (3,6)	3,8	0,8 – 18,3	0,09

¹Hodnota OR odpovídá rozdílu mezi nosiči mutace a zdravými pacientkami.

²Počet pacientek, u nichž byl klinický údaj k dispozici.

Tabulka 20: Porovnání klinických charakteristik nosiček mutací v genu *BRCA1/2* a pacientek bez mutace

4. Klinická a histopatologická charakteristika pacientek s mutací v genu *NBN*

Ve vybrané skupině celkem 1190 pacientek s histologicky verifikovaným karcinomem prsu bylo identifikováno 0,21 % (1/487; p=1,0) nosiček mutace 657del5 v podskupině vysokorizikových pacientek (tabulka č. 21) a 0,28 % (2/703; p=0,8) s toutéž mutací ve skupině neselektovaných pacientek s karcinomem prsu (tabulka č. 19). V téže skupině pacientek pouze s karcinomem prsu nebyla mezi vysokorizikovými pacientkami zachycena žádná nosička mutace R215W (tabulka č. 20). Naproti tomu byla tato mutace indetifikována u 3 pacientek (0,43 %) s neselektovaným karcinomem prsu (tabulka č. 19). Mutace V210F byla u žen s diagnostikovaným karcinomem prsu nalezena jednou ve skupině

vysokorizikových pacientek (0.17%) (tabulka č.20) a u 2 pacientek (0,28 %) s toutéž mutací ve skupině 703 neselektovaných pacientek (tabulka č.19). Ve skupině žen s karcinomě prsu byl zachycen pouze jeden pŕípad medulárního histopatologického typu karcinomu u nosičky mutace 657del5 z vysokorizikové skupiny. Ve skupině 96 vysokorizikových pacientek s diagnózou karcinomu ovaria byly detekovány 2 pacientky (1 %) s mutacemi, a to jedna s mutací 657del5 a jedna s mutací R215W (tabulka č. 20). Mezi 17 testovanými muži s diagnózou karcinomu prsu nebyla v testované oblasti genu *NBN* zachycena žádná genová alterace (tabulka č. 20).

Název mutace dle cDNA	c.657_661del5	c.643C>T	c.628G>T	c.595C>T	c.596C>G
Předpokládaný efekt mutace	p.K219Nfs*16	p.R215W	p.V210F	p.P199S	p.P199R
Pacientky s karcinomě prsu (N=487)	1 (0,21 %)	0	1(0,21%)	1(0,21%)	0
Pacientky s karcinomě ovarii (N=96)	1 (1 %)	1 (1 %)	0	0	0
Muži s karcinomě prsu (N=17)	0	0	0	0	0

Tabulka 21: Nosiči mutace v genu *NBN* ze skupiny vysoce rizikových pacientů s karcinomě prsu a/nebo ovarii

5. Databáze pacientek s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovaria

V rámci této práce byl dokončen a systematizován databázový katalog pacientek s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu a/nebo ovarii, v němž jsou jednotlivé pacientky kategorizovány podle kritérií, jako je věk v době diagnózy, rodinná anamnéza karcinomu prsu a/nebo ovarii a pravděpodobnost rizika nosičství mutace v hlavních predispozičních genech stanovená pomocí programu BrcaPro[194, 195]. Tato multifunkční databáze nadále slouží při výzkumu mutací v predispozičních genech v Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK.

V. DISKUZE

1. *BRCA1* a *BRCA2*

Mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* jsou od svého objevu před dvaceti lety intenzivně studovány v populacích vysokorizikových pacientů, zatímco význam mutací těchto genů v neselektované populaci pacientů s karcinomem prsu není zcela objasněn. Jedním z cílů této práce je zjistit, jakou frekvenci mají vybrané rekurentní mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2*, o nichž se předpokládá, že jsou v České republice populačně specifické, v neselektované populaci pacientek s karcinomem prsu.

V souboru pacientek s karcinomem prsu, jež nebyly nijak selektovány podle rodinné anamnézy, bylo zachyceno 2,4 % nosiček sledovaných mutací v hlavních predispozičních genech. Výběr testovaných mutací a úseků DNA byl proveden na základě výsledků analýzy souborů vysokorizikových pacientů, které byly vyšetřovány v České republice v letech 2003-2008.[132, 133, 216] V těchto studiích dosahovaly mutace sledované v této práci v součtu 83% zastoupení všech mutací nalezených v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Souběžně s touto prací pokračovaly analýzy predispozičních genů u nově indikovaných pacientů. V kontextu aktualizovaných dat [135] (včetně výsledků doplněné analýzy rozsáhlých genomových přestaveb[26], tabulky č. 4, 5 a 6) lze odhadnout, že předkládaná práce zachytila asi polovinu identifikovaných mutací a celkovou frekvenci patogenních mutací v hlavních predispozičních genech u pacientek se sporadickým karcinomem prsu je tak možné stanovit na přibližně 5 %. Studie navržené podobně jako předkládaná práce zjišťovaly frekvenci rekurentních krátkých mutací v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* v různých evropských populacích. Ve Finsku dosahovala 1,8 % [218], v Norsku 2,5 % [219] a v Maďarsku 3,6 % [220]. V Polsku bylo zaznamenáno 5,7 % neselektovaných pacientek s časným nástupem karcinomu s jednou ze tří rekurentních mutací v těchto genech.[221]

Ve Velké Británii bylo na základě analýzy celé kódující sekvence genů *BRCA1* a *BRCA2* metodou MHA odhadnuto, že frekvence nosičů mutace v obou genech v neselektované populaci pacientů s karcinomem prsu dosahuje 3,4 %.[222] Ve Spojených státech amerických byla mutace v celé kódující sekvenci obou genů nalezena u 4,7 % žen s karcinomem prsu diagnostikovaných mezi 35 a 64 roky života.[223]

V české populaci frekvence krátkých rekurentních mutací přibližně odpovídá výsledkům publikovaným ve výše uvedených studiích. Frekvence rozsáhlých přestaveb v genech *BRCA1* a *BRCA2* studovaných v evropských populacích dosahuje asi 8-27 % krátkých mutací identifikovaných v těchto genech. [26]. Upravíme-li na základě tohoto údaje frekvence výše

popsaných studií krátkých rekurentních mutací, nebudou se významně lišit od celkové frekvence výskytu mutací v genu *BRCA1* a *BRCA2* u neselektovaných pacientek, která byla v předkládané práci stanovena na přibližně 5 %.

Zastoupení nejčastější mutace 5382insC v genu *BRCA1* v neselektované populaci studované v této práci se významně nelišilo od jejího zastoupení u vysokorizikových pacientů (tabulka č. 4), u neselektovaných pacientů byla zachycena v 50 % případů (7/14), zatímco u pacientů z vysokým rizikem byla identifikována ve 45 % případů (59/132). Druhá nejčastější mutace 300T>G měla ve skupině vysokorizikových pacientů nižší zastoupení, a to 8 % (11/132) oproti 21 % (3/14) v souboru neselektovaných pacientů s karcinomem prsu. Další nalezené rekurentní mutace (1806C>T a 3819del5 v genu *BRCA1* a 5991insT a 5873C>T v genu *BRCA2*) se v populaci neselektovaných pacientek vyskytovaly s výrazně nižší frekvencí. Mutace 1135insA a 2607dup10 zaznamenané v genu *BRCA1*, jež byly již dříve identifikovány u vysokorizikových pacientek v Masarykově onkologickém ústavu v Brně [132], nebyly dosud v souboru vysokorizikových pacientek z Prahy a okolí, který byl studován naší laboratoří, zachyceny.

Ve shodě s dříve publikovanými údaji [148] měly pacientky, u nichž byla prokázána některá ze sledovaných mutací v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*, nižší věk v době diagnózy invazivního karcinomu prsu než pacientky, u kterých sledované mutace prokázány nebyly. Ve skupině pacientek, jimž byl invazivní karcinom prsu diagnostikován do 50 let věku, byl záchyt mutací vyšší – 3,9 % (8/207) – než ve skupině pacientek diagnostikovaných po 50. roku života – 1,8 % (8/444).

Ve skupině 12 pacientek, v jejichž rodině se vyskytovala příbuzná s karcinomem ovaria, byly zaznamenány dvě nosičky (16,7 %) mutace 5382inscC v genu *BRCA1*. U jedné z těchto nosiček onemocněla karcinomem ovarií matka v 50 letech a matka matky také v 50 letech, zatímco u druhé z nosiček se jednalo o sestru, u níž věk v době diagnózy nebyl znám. Obě tyto pacientky byly diagnostikovány pod 50 let věku (44 a 46 let), a byly tak indikovány ke genetickému vyšetření. Uvedené případy ukazují, že přítomnost karcinomu ovarií v rodině představuje u pacientky s invazivním karcinomem prsu silný rizikový faktor. Tento výsledek je v souladu s výsledky studií provedených na souboru neselektovaných pacientek s karcinomem prsu ve Finsku [218] a na souboru neselektovaných pacientek s časným nástupem karcinomu prsu ve Španělsku [224].

Naproti tomu ve skupině 80 pacientek s pozitivní rodinnou anamnézou karcinomu prsu byla zachycena pouze jedna mutace 300T>G v genu *BRCA1* (1,3 %), a to u pacientky diagnostikované v 61 letech, jejíž matka onemocněla karcinomem prsu v 57 letech. Tato

pacientka nesplňovala indikační kritéria pro genetické vyšetření a mohla by být vhodným kandidátem pro další výzkum, který by měl za cíl odhalit dosud neznámé genetické či environmentální faktory, díky nimž se u odolnějšího („resilient“) nosiče patogenní mutace neprojeví onemocnění v době, jež je pro jeho nástup typická, a které by tak mohly přinést nový pohled na jeho patogenezi, případně i na jeho léčbu. [225]

Medulární histopatologický typ se vyskytuje u přibližně 2-3 % všech pacientů s karcinomem prsu [226], avšak u nosičů mutace v *BRCA1* bývá diagnostikován v neproporciálně vyšším počtu případů (až 13 %)[23]. V celém studovaném souboru byl tento histopatologický typ zachycen ve 3,3 % případů (19/574), z toho 4 případy byly nosičkami jedné ze zkoumaných mutací (21 %). U žádné z nich sice nebyla zaznamenána pozitivní rodinná anamnéza karcinomu prsu ani ovaria, ale jedné z nich bylo v době diagnózy 28 let, jedné byl diagnostikován bilaterální karcinom a jedné triple-negativní karcinom prsu, který často bývá s nosičstvím mutace v genu *BRCA1* spojován.[150, 227] Naše výsledky jsou v souladu se studií Eisingera et al., který našel mutaci v genu *BRCA1* u 11 % pacientek s medulárním karcinomem prsu neselektovaných podle rodinné anamnézy.[228] Uvedené výsledky potvrzují medulární histopatologický typ karcinomu prsu bez ohledu na rodinnou anamnézu či na věk v době diagnózy jako vhodné indikační kritérium pro pacientky s karcinomem prsu v České republice. Ačkoli jsou indikační kritéria americké NCCN ve většině ukazatelů širěji nastavená než kritéria česká, není zde překvapivě indikační kritérium medulárního histopatologického typu karcinomu vůbec zohledněno a doporučuje se pouze testovat pacientky s triple-negativním karcinomem prsu diagnostikovaným pod 60 let věku.[180]

Mezi 16 nosičkami sledovaných mutací v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* zachycených v této studii by indikační kritéria založená na rodinné anamnéze nádorového onemocnění zachytila pouze 2 pacientky. Další 4 pacientky by byly ke genetickému vyšetření indikovány na základě nízkého věku v době diagnózy, bilaterálního karcinomu prsu s prvním nádorem diagnostikovaným do 50 let věku a na základě medulárního histopatologického typu či triple-negativního karcinomu. Překvapujícím zjištěním předkládané práce je fakt, že celých 10 ze 16 zachycených nosiček by na základě indikačních kritérií přijímaných v současnosti v České republice vůbec nebylo odesláno ke genetickému vyšetření. Kritéria americké NCCN[180] stejně jako doporučení ESMO[196] by dokonce vedla k indikování pouze 5 pacientek.

Důvodů, proč by tyto pacientky nebyly zachyceny současnými indikačními kritérii, může být několik.¹ První problém představují nejasnosti při odběru rodinné anamnézy. Častým omylem[182] může být kupříkladu nedostatečné zohlednění mužské linie v rodinách, kde převažují muži. Nosičství patogenní mutace v genu *BRCA1* nebo *BRCA2* může sice u mužů vést ke zvýšenému riziku dalších malignit (karcinomu prsu, prostaty, pankreatu, kolorektálního karcinomu atd.), ale není vždy spojováno s časnějším nástupem těchto onemocnění [29, 30, 140]. Proto pokud se toto nosičství neprojeví v rodině přímo výskytem karcinomu prsu u muže, je pravděpodobné, že česká indikační kritéria ke genetickému vyšetření vůbec nemusí zachytit pacientky, v jejichž rodinách je převaha mužů a patogenní mutace je přenášena mužskou linií.

Dalším aspektem odběru rodinné anamnézy, který může být důvodem vyloučení některých českých nosiček z genetického vyšetření a na něž je v indikačních kritériích NCCN pamatováno[180], může být nedostatek informací o pokrevních rodinných příslušnících, ať už z důvodů adopce či přerušení rodinných kontaktů. Dojde-li navíc k úmrtí nosiče mutace z jiných příčin ještě před věkem, který je pro nástup nádorového onemocnění typický, neupozorní časný nástup onemocnění na možnost familiárního přenosu. Dokladem toho, za jak klíčový je v poslední době považován kvalitní odběr rodinné anamnézy, je vytváření různých nástrojů, jež k němu mají dopomoci (např. specializované weby jako je „My family health portrait“[229] atd.).[182, 230]

V neposlední řadě pak fakt, že by téměř dvě třetiny nosiček ze sledovaného souboru nebyly v současnosti u nás užívanými indikačními kritérii odhaleny, může souviset s nižší penetrancí patogenních mutací v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* pozorovanou v populačních studiích.[231] Kromě modifikátorů rizika[142] zde pravděpodobně hraje roli synergický efekt více genetických i epigenetických faktorů, které se na typickém fenotypu syndromu HBOC spolupodílejí, avšak jejich výskyt není vázán na přenos konkrétní patologické mutace. Tomuto výkladu by odpovídalo i zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu a/nebo ovaria, jež plyne z rodinného vztahu k nosiči patogenní mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2*, aniž by byl přenos konkrétní mutace prokázán. Například podle Metcalfa et al. je toto riziko oproti běžné populaci téměř čtyřnásobné.[232]

Je pravděpodobné, že masivní zapojení metod paralelního sekvenování pomůže tyto otázky z velké části zodpovědět. I v tomto kontextu má však stanovování populačně specifických

¹ Všechny pacientky, u nichž byla v rámci tohoto výzkumu zachycena patogenní mutace v genu *BRCA1* nebo *BRCA2*, ať už by indikační kritéria splňovaly či nesplňovaly, byly samozřejmě odeslány do genetické ambulance VFN, kde jsou nadále sledovány.

mutací v přesně definovaných populacích své opodstatnění[33] a díky jemu by tyto mutace mohly být vyšetřovány celoplošně u všech pacientek s karcinomem prsu či alespoň u skupin pacientek, jež by byly vymezeny širěji než podle současných indikačních kritérií.

2. *NBN*

Jelikož se gen *NBN* účastní komplexní buněčné odpovědi na poškození DNA, na které spolupracuje mj. s geny *BRCA1* a *BRCA2*, byl vytipován jako další kandidátní gen, jehož patogenní mutace by mohly zvyšovat riziko vzniku karcinomu prsu. Toto riziko u různých populací se pokusila vyjádřit celá řada studií. Celosvětově byla nejvíce studována delece pěti nukleotidů 657del5 v exonu 6, která se v homozygotním stavu nachází až u 90 % pacientů s NBS1 syndromem ze střední a východní Evropy.[104, 164, 172, 174, 175, 217, 233, 234] Jedním z cílů předkládané práce je proto stanovit frekvenci této mutace v České republice, a to konkrétně v souboru vysokorizikových pacientů bez prokázané mutace v hlavních predispozičních genech, v souboru neselektovaných pacientek s karcinomem prsu a v kontrolním souboru jedinců bez diagnostikovaného nádorového onemocnění. Kromě výše zmíněné mutace byla v rámci této studie sledována další alterace tohoto genu v exonu 6 R215W, u níž byl prokázán negativní vliv na funkci genového produktu, což pravděpodobně zvyšuje riziko vzniku maligního onemocnění [104, 171, 172], a dále mutace V210F, která byla již dříve popisována, ale její význam není dostatečně objasněn.[90, 163] Další mutace I171V v exonu 5 genu *NBN*, u níž se také předpokládá zvýšení rizika vzniku nádorového onemocnění[217], do testované oblasti nebyla zahrnuta.

Výsledky předkládané analýzy jsou v rozporu s některými dříve publikovanými pracemi. V polské studii z okolí Štětína bylo zachyceno 3,7 % (3/80) nosičů mutace 657del5 v souboru pacientů s rodinným výskytem karcinomu prsu, dále 1,3 % (2/150) nosičů téže mutace v souboru konsekutivních pacientek s karcinomem prsu diagnostikovaných pod 50 let věku a 0,6 % (3/530) nosičů mezi zdravými kontrolami.[174] Ve středním Polsku bylo nalezeno 1,96 % (11/562) nosičů mutace 657del5 u neselektovaných pacientek s karcinomem prsu, zatímco u zdravých kontrol byla tato mutace identifikována pouze v 0,62 % (10/1620) případech. Kromě toho byla v téže studii zachycena v jednom případě mutace V210F, zatímco mutace R215W nebyla detekována vůbec.[175] Ve velkém souboru neselektovaných pacientů s karcinomem prsu z Běloruska bylo identifikováno 0,9 % (15/1588) nosičů mutace 657del5 a 0,6 % (9/1588) nosičů mutace R215W. V kontrolním souboru pak bylo nalezeno 0,1 % (1/1014) nosičů mutace 657del5 a 0,49 % (5/1014) nosičů mutace R215W. Stejná studie odhalila 0,1 % (1/1076) nosičů mutace 657del5 a 0,8 % (9/1076) nosičů mutace

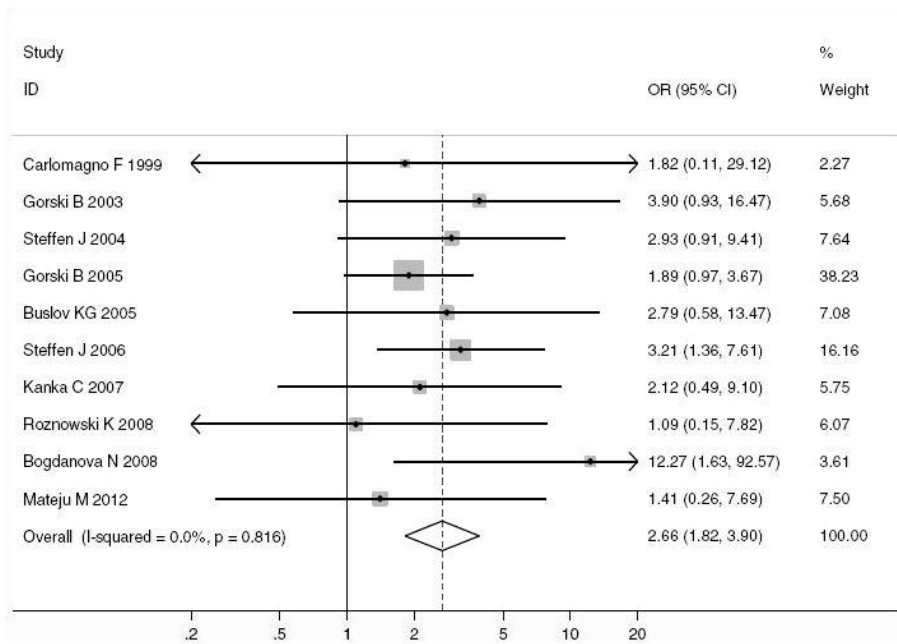
R215W v souboru neselektovaných pacientek s karcinomem prsu ze severního Německa. V kontrolním severoněmeckém souboru nebyla mutace 657del5 vůbec nalezena a nosiči mutace R215W byli zachyceni v 0,2 % (2/1017) případů.[172]

Se závěry jiné německé studie se naopak výsledky předkládané práce shodují. V neselektovaném souboru německých pacientů s karcinomem prsu pod 51 let byla detekována jedna mutace 657del5 (1/477; 0,21 %), stejně jako v kontrolním souboru (1/866; 0,12 %).[235]

Podle výsledků předkládané práce je frekvence sledovaných mutací v genu *NBN* v ČR nízká. V našem souboru neselektovaných pacientů s karcinomem prsu byla u mutace 657del5 zaznamenána 5krát nižší frekvence než v odpovídajícím běloruském souboru a 10krát nižší frekvence než v odpovídajícím souboru ze středního Polska. Frekvence této mutace v našem souboru neselektovaných pacientek s karcinomem prsu se významně nelišila od její frekvence zaznamenané v kontrolních souborech zdravých jedinců z Běloruska a dokonce byla 2krát nižší než frekvence v obou výše uvedených kontrolních skupinách z Polska. Jelikož frekvence mutace 657del5 byla v naší skupině pacientů s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu i v našem souboru neselektovaných pacientek s karcinomem prsu jen mírně vyšší než v kontrolním souboru jedinců bez diagnostikovaného nádorového onemocnění; 0,33 % vs 0,22 %; $p=0,67$, resp. 0,28 % vs 0,22 %; $p=0,4$; a vzhledem k její celkově nízké frekvenci ve sledovaných populacích neprokázala předkládaná práce signifikantní souvislost mezi nosičstvím mutace 657del5 a zvýšením rizika vzniku karcinomu prsu v České republice.

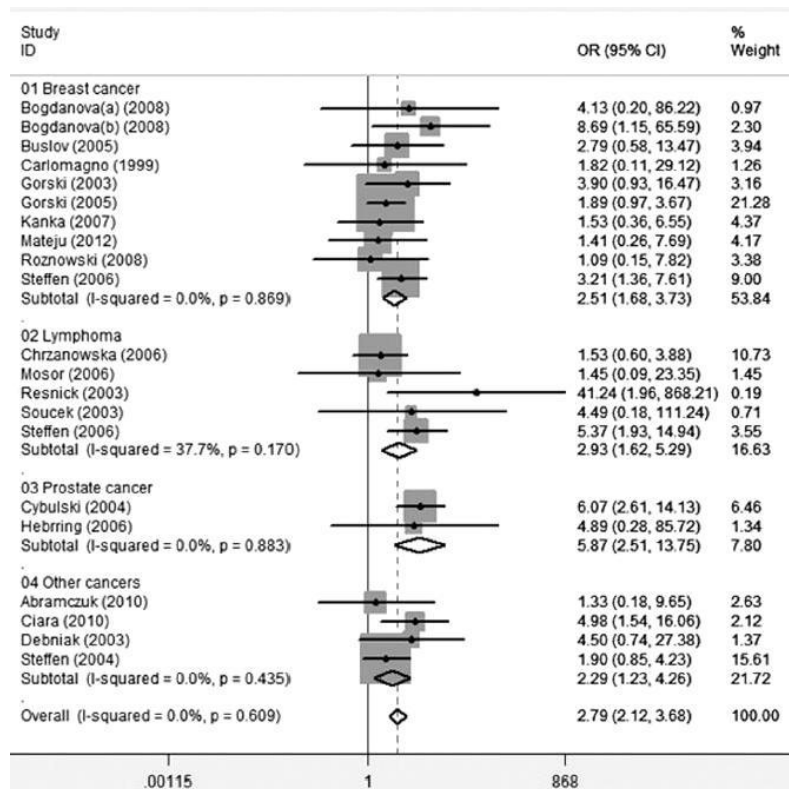
Frekvence mutace R215W v našem souboru neselektovaných pacientů s karcinomem prsu se významně nelišila od frekvence zjištěné u neselektovaných pacientů z Běloruska (0,4 % vs 0,6 %) a byla jen mírně nižší než frekvence v odpovídajícím severoněmeckém souboru (0,4 % vs 0,8 %). Vzhledem k tomu, že frekvence mutace R215W ve studované skupině pacientů s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu byla dokonce nižší než ve skupinách neselektovaných pacientek s karcinomem prsu a u zdravých kontrol, nepotvrzuje předkládaná práce ani asociaci nosičství mutace R215W se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu v České republice.

Výsledky jednotlivých studií, které měly za cíl posoudit vliv nosičství mutace 657del5 na riziko vzniku karcinomu prsu, nebyly v celosvětovém měřítku průkazné. Recentně publikovaná metaanalýza, do níž bylo spolu s předkládanou prací zavzato celkem 10 studií o celkovém počtu 25 365 případů, stanovila přibližně 2,5násobné riziko vyplývající z nosičství této mutace ($OR=2,66$; 95% CI 1,82-3,9; $p<0,001$) (obrázek 25).[234]

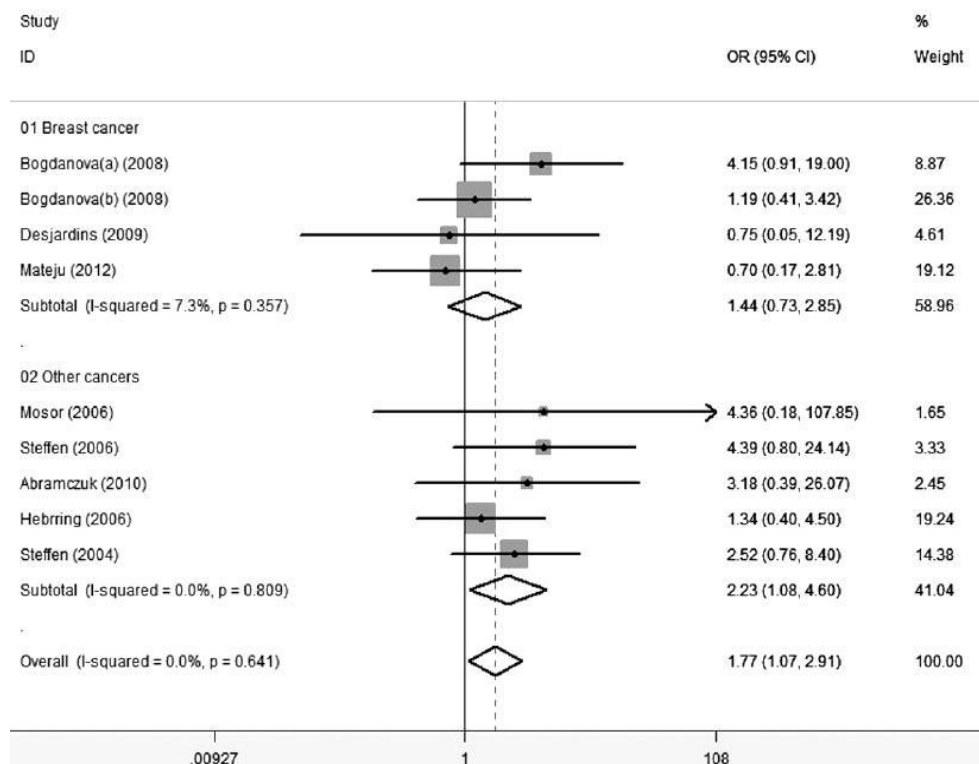


Obrázek 25: Metaanalýza stanovující asociaci nosičství mutace 657del5 v genu *NBN* s rizikem vzniku karcinomu prsu, převzato z[234]

Do další nedávno publikované metaanalýzy, jež měla za cíl posoudit vztah vybraných alterací v genu *NBN* k celkovému riziku vzniku nádorového onemocnění, bylo spolu s předkládanou prací zařazeno 60 publikací o souhrnném počtu 39 731 případů nádorového onemocnění a 64 957 kontrol. Podle této metaanalýzy zvyšuje mutace 657del5 riziko vzniku nádorového onemocnění u svého nosiče 2,8krát (OR=2,79; 95% CI 2,17-3,68; $p < 0,001$) (obrázek 26) a mutace R215W zvyšuje toto riziko asi 1,8krát (OR=1,77; 95% CI 1,07-2,91; $p < 0,025$) (obrázek 27).[233]



Obrázek 26: Metaanalýza stanovující asociaci nosičství mutace 657del5 v genu *NBN* s rizikem vzniku nádorového onemocnění, převzato z [233]



Obrázek 27: Metaanalýza stanovující asociaci nosičství mutace R215W v genu *NBN* s rizikem vzniku nádorového onemocnění, převzato z [233]

Jelikož tato metaanalýza stanovila riziko pro mutaci I171V vyšší než pro obě studované mutace (OR=3,93; 95% CI 1,68-9,2; $p < 0,002$), zůstává otázkou, nakolik by její zařazení do testované oblasti genu *NBN* změnilo výsledky předkládané práce.

Ve světle závěrů výše zmíněných metaanalýz by bylo možné uvažovat o zařazení testování mutací v genu *NBN* do rutinního genetického vyšetření osob se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu. Stejně jako u testování jiných genů se střední a nízkou penetrancí je však i v tomto případě klinická interpretace výsledků komplikovaná, protože dosud nebyla přijata závazná klinická doporučení ohledně dispenzární péče o osoby, které nesou mutace v genu *NBN*. Vznikající nejasnosti pak mohou zbytečně problematizovat jak rozhodování lékaře ohledně dalšího postupu, tak přijetí sdělované zprávy pacientem. Případné nadhodnocení rizika spojeného s mutacemi v genu *NBN*, jak tomu bylo ve starších studiích mutací v genu *CHEK2*, by mohlo vést k chybným klinickým závěrům a v případě indikace radikálnějších či jiných preventivních operačních výkonů by v konečném důsledku mohlo pacientky poškodit.[213, 214] K plnohodnotné klinické interpretaci rizika souvisejícího s nosičstvím mutace v genu *NBN* je zapotřebí dalších studií.[177]

VI. ZÁVĚR

Karcinom prsu představuje společensky významné onemocnění, a to jak vzhledem k vysoké incidenci a mortalitě, tak vzhledem k vysokým nákladům na diagnostiku i léčbu. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, na jehož rozvoji se podílejí jak genetické, tak negenetické faktory. Z genetického hlediska se karcinom prsu vyvíjí na podkladě kumulace nově vzniklých či vrozených genetických alterací v buňkách prsní žlázy. Nejčastěji jsou postiženy geny podílející se na regulaci buněčného cyklu a udržování stability genomu. Za nejvýznamnější geny, jež souvisejí s hereditárním výskytem karcinomu prsu a ovarií, jsou považovány *BRCA1* a *BRCA2*. Předpokládá se, že v rodinách, u nichž nebyla prokázána patogenní mutace v hlavních predispozičních genech, mohou mít na zvýšení rizika vzniku karcinomu prsu vliv též geny se střední a nízkou penetrancí, např. *NBN*.

Prvním cílem předkládané práce bylo stanovit frekvenci rekurentních mutací v neselektované populaci pacientů s diagnostikovaným karcinomem prsu. Ve studovaném souboru pacientek s karcinomem prsu, jež nebyly nijak selektovány podle rodinné anamnézy, bylo zachyceno 2,4 % nosiček sledovaných mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Celková frekvence patogenních mutací v hlavních predispozičních genech pak byla na základě četnosti výskytu rozsáhlých genomových přestaveb stanovena v české neselektované populaci žen s diagnózou karcinomu prsu přibližně na 5 %, což odpovídá výsledkům zjištěným u jiných evropských populací. Zda jsou sledované rekurentní mutace populačně specifické v celé České republice lze spolehlivě určit za předpokladu, že by výsledky dosud publikovaných studií byly doplněny dalšími údaji z mimopražských a mimobrněnských regionů. Spektrum testovaných rekurentních mutací by dále bylo vhodné rozšířit o rozsáhlou delecii exonu 5-14 v genu *BRCA1*, která byla vícekrát zaznamenána jak v Čechách, tak na Moravě.

Výsledky předkládané práce potvrzují kromě efektivity indikačních kritérií založených na rodinné anamnéze jako vhodné indikační kritérium ke genetickému vyšetření pacientek s vysokým rizikem hereditárního výskytu karcinomu prsu a/nebo ovarií zejména medulární histopatologický typ karcinomu.

10 ze 16 (62,5%) zachycených nosiček by na základě indikačních kritérií přijímaných v současnosti v České republice vůbec nebylo odesláno ke genetickému vyšetření. Nejpravděpodobnějším důvodem může být nepřesně odebraná či málo detailní rodinná anamnéza, jejíž zkvalitnění a objektivizace metodiky jejího odběru by mohly významně zvýšit záchytnost nosiček. Další důvod může souviset s nižší penetrancí patogenních mutací v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* pozorovanou v souborech pacientů se sporadickým karcinomem, na které se kromě modifikátorů rizika pravděpodobně podílí

i synergický efekt více genetických i epigenetických faktorů, které společně vedou k typickému fenotypu HBOC, avšak jejich výskyt není vázán na přenos konkrétní patologické mutace. Tomuto výkladu by odpovídalo i zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu a/nebo ovaria, jež plyne z rodinného vztahu k nosiči patogenní mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2*, aniž by byl prokázán přenos konkrétní mutace.

Stanovování populačně specifických mutací v přesně definovaných populacích má své opodstatnění i v době nových metod sekvenování, jelikož by jeho pomocí mohly být mutace vyšetřovány celoplošně u všech pacientek s karcinomem prsu. Testování rekurentních mutací je rychlé, technicky i ekonomicky únosné a umožnilo by zachytit významnou část nosičů mutace ještě před primárním chirurgickým výkonem, což je klíčové jak pro stanovení rozsahu chirurgického výkonu, tak pro volbu vhodné neodjuvantní či adjuvantní léčby.

V rámci této práce byl v souladu s jejími cíli dokončen a systematizován též multifunkční databázový katalog pacientek s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu, který nadále slouží při výzkumu genetických alterací v predispozičních genech v Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK.

Dalším cílem předkládané práce bylo stanovit frekvenci nejčastějších patogenních mutací genu *NBN* ve vybraných populacích v České republice a na základě získaných výsledků eventuálně navrhnout rozšíření spektra testovaných genů u pacientek s vysokým rizikem hereditárního výskytu karcinomu prsu a/nebo ovarii o gen *NBN*.

Jelikož frekvence sledovaných mutací v testovaném úseku 6. exonu genu *NBN* byla obdobná jak ve skupině pacientů s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu a/nebo ovarii, tak v neselektované skupině pacientů s diagnostikovaným karcinomem prsu, tak v kontrolním souboru jedinců bez diagnostikovaného nádorového onemocnění, a vzhledem k její celkově nízké frekvenci ve sledovaných populacích neprokázala předkládaná práce signifikantní souvislost mezi nosičstvím patogenních mutací v genu *NBN* a zvýšením rizika vzniku karcinomu prsu v České republice. Zjištěná frekvence sledovaných mutací v genu *NBN* je v průměru 3-5x nižší než u jiných středoevropských populací. Na základě výsledků předkládané práce nelze rutinní vyšetřování mutací v genu *NBN* u pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovarii v České republice doporučit. Ačkoli nedávno publikované metaanalýzy popsaly signifikantní vztah mezi nosičstvím mutace v genu *NBN* a rizikem vzniku karcinomu prsu, respektive nádorového onemocnění, k plnohodnotné klinické interpretaci rizika souvisejícího s nosičstvím mutace v genu *NBN* je zapotřebí dalších studií.

Poděkování

Děkuji mnohokrát oběma svým školitelům Doc. MUDr. Janu Novotnému, Ph.D., a Doc. MUDr. Petru Pohlreichovi, CSc., za inspiraci i pomoc.

Doc. MUDr. Zdeňku Kleiblovi, Ph.D. jsem vděčný za radu ve chvíli, kdy jsem ji nejvíc potřeboval.

RNDr. Ivaně Tiché, Ph.D., i všem kolegům a kolegyním z laboratoře a z kliniky, svým rodičům a své manželce děkuji za podporu.

V Praze dne 14. června 2014

Martin Matějů

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
A	<u>a</u> denin
Alu	repetitivní DNA sekvence v lidském genomu z třídy krátkých rozptýlených repetitivních (pův. popsána jako sekvence citlivá k restriční endonukleáze z organismu <i>Arthrobacterium luteus</i>)
ANOVA	analýza rozptylu (<u>a</u> nalysis of <u>v</u> ariance)
AR	<u>a</u> ndrogenní <u>r</u> eceptor
ATM	gen <i>ATM</i> (<u>a</u> taxia <u>t</u> elangiectasia <u>m</u> utated)
<i>BACH1</i>	gen <i>BACH1</i> (<u>B</u> TB and <u>C</u> NC <u>h</u> omology <u>1</u> , basic leucine zipper transcription factor 1)
<i>BARD1</i>	gen <i>BARD1</i> (<u>B</u> RCA1- <u>a</u> ssoiated <u>R</u> ING <u>d</u> omain1)
BASC	<u>B</u> RCA1 genome <u>s</u> urveillance <u>c</u> omplex
Bcl-2	<u>B</u> -cell lymphoma2
<i>BRCA1</i>	gen <i>BRCA1</i> (<u>b</u> reast <u>c</u> ancer <u>1</u> , early onset)
<i>BRCA2</i>	gen <i>BRCA2</i> (<u>b</u> reast <u>c</u> ancer <u>2</u> , early onset)
BRCT	<u>B</u> RCA1 C <u>t</u> erminal <u>d</u> omain
<i>BRIP1</i>	gen <i>BRIP1</i> (<u>B</u> RCA1 <u>i</u> nteracting <u>p</u> rotein C-terminal helicase 1)
C	<u>c</u> ytosin
<i>CASP-8</i>	gen <i>CASP-8</i> (<u>C</u> aspase <u>8</u> gene)
<i>Cdc25A</i>	gen <i>Cdc25A</i> (<u>c</u> ell <u>d</u> ivision <u>c</u> ycle <u>25A</u>)
<i>Cdc25C</i>	gen <i>Cdc25C</i> (<u>c</u> ell <u>d</u> ivision <u>c</u> ycle <u>25C</u>)
cDNA	komplementární kyselina deoxyribonukleová (<u>c</u> omplementary <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
CI	konfidenční interval (<u>c</u> onfidence <u>i</u> nterval)
CIMBA	<u>C</u> onsortium of <u>I</u> nvigators of <u>M</u> odifiers of <u>B</u> RCA1/2
CK18	<u>c</u> yto <u>k</u> eratin <u>18</u>
CK8	<u>c</u> yto <u>k</u> eratin <u>8</u>
CNS	<u>c</u> entrální <u>n</u> ervová <u>s</u> oustava
CT	počítačová tomografie (<u>c</u> omputed <u>t</u> omography)
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
DBD	DNA-vázací doména (<u>D</u> NA- <u>b</u> inding <u>d</u> omain)
DCIS	duktální karcinom <i>in situ</i> (<u>d</u> uctal <u>c</u> arcinoma <i>in situ</i>)
DHPLC	denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<u>d</u> enaturing <u>h</u> igh- <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
DNA	kyselina deoxyribonukleová (<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
dNTP	deoxynukleotid trifosfát (<u>d</u> eoxy <u>n</u> ucleotide <u>t</u> riphosphate)
DSB	dvouřetězcové zlomy (<u>d</u> ouble <u>s</u> trand <u>b</u> reaks)
dsDNA	dvouřetězcová kyselina deoxyribonukleová (<u>d</u> ouble <u>s</u> tranded <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (<u>e</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra <u>a</u> cetic <u>a</u> cid)
EGF	epidermální růstový faktor (<u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
EGFR	receptor pro lidský epidermální růstový faktor ErbB-1 čili HER1 (epidermal growth factor receptor)
EMQN	<u>E</u> uropean <u>M</u> olecular Genetics <u>Q</u> uality <u>N</u> etwork
ER	<u>e</u> strogenový <u>r</u> eceptor
ErbB-1	receptor pro lidský epidermální růstový faktor, též EGFR či HER1

ErbB-2	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 čili HER2/neu
ErbB-3	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 3 čili HER3
ErbB-4	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 4 čili HER4
EREs	estrogenové responzivní elementy (<u>e</u> strogen <u>r</u> esponsive <u>e</u> lements)
ER α	estrogenové receptory alfa
ER β	estrogenové receptory beta
ESMO	<u>E</u> uropean <u>S</u> ociety for <u>M</u> edical <u>O</u> ncology
<i>FANCD2</i>	gen <i>FANCD2</i> (<u>F</u> anconi <u>a</u> nemia, <u>c</u> omplementation group <u>D2</u>)
<i>FGF1</i>	fibroblastový růstový faktor 1 (<u>f</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>1</u>)
FGFR2	receptor pro fibroblastový růstový faktor 2
FHA	<u>f</u> ork <u>h</u> ead- <u>a</u> ssociated
G	<u>g</u> uanin
GIT	<u>g</u> astro <u>i</u> ntestinální <u>t</u> rakt
GnRH	gonadotropiny uvolňující hormony (<u>g</u> onadotropin- <u>r</u> eleasing <u>h</u> ormone)
GWAS	celogenomová asociační studie (<u>g</u> enome- <u>w</u> ide <u>a</u> ssociation <u>s</u> tudy)
HBOC	syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovárií (<u>h</u> ereditary <u>b</u> reast and <u>o</u> varian <u>c</u> ancer syndrome)
HER1	receptor pro lidský epidermální růstový faktor, též EGFR či ErbB-1 (<u>h</u> uman <u>e</u> pidermal growth factor receptor)
HER2/neu	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 čili ErbB-2 (<u>h</u> uman <u>e</u> pidermal growth factor receptor 2)
HER3	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 3 čili ErbB-3 (<u>h</u> uman <u>e</u> pidermal growth factor receptor 3)
HER4	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 4 čili ErbB-4 (<u>h</u> uman <u>e</u> pidermal growth factor receptor 4)
HR	<u>h</u> omologní <u>r</u> ekombinace
HRMA	vysokorozlišovací analýza křivek tání (<u>h</u> igh- <u>r</u> esolution <u>m</u> elting <u>a</u> nalysis)
<i>CHEK2</i>	gen <i>CHEK2</i> (<u>c</u> heckpoint <u>k</u> inase <u>2</u>)
CHK2	proteinový produkt genu <i>CHEK2</i> (<u>c</u> heckpoint <u>k</u> inase <u>2</u>)
ILC	invazivní lobulární karcinom (<u>i</u> nvasive <u>l</u> obular <u>c</u> arcinoma)
kDa	kilodalton
Ki67	antigen Ki67
LCIS	lobulární karcinom <i>in situ</i> (<u>l</u> obular <u>c</u> arcinoma <u>i</u> n <u>s</u> itu)
LINEs	rozptýlené dlouhé repetice (<u>l</u> ong <u>i</u> nterspread <u>e</u> lements)
<i>LKB1/STK11</i>	gen <i>LKB1/STK11</i> (serine/threonine kinase 11)
LOH	ztráta heterozygoty (<u>l</u> oss <u>o</u> f <u>h</u> eterozygosity)
MG	mamografie
MHA	analýza multiplexových heteroduplexů (<u>m</u> ultiplex <u>h</u> eteroduplex <u>a</u> nalysis)
MIB1	antigen MIB1
MLPA	<u>m</u> ultiplex <u>l</u> igation-dependent <u>p</u> robe <u>a</u> mplification
MRE11	protein MRE11
MRI	nukleární magnetická rezonance (<u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance <u>i</u> maging)
MRN	<u>M</u> RE11/ <u>R</u> AD50/ <u>N</u> BN komplex
<i>myc</i>	<u>m</u> yelocytomatosis viral oncogene
<i>NBN</i>	gen nibrin čili <i>NBS1</i> (<u>N</u> ijmegen <u>b</u> reakage <u>s</u> ndrome 1)

<i>NBR1</i>	gen <i>NBR1</i> (<u>n</u> eighbor of <u>B</u> RCA1 gene <u>1</u>)
<i>NBR2</i>	gen <i>NBR2</i> (<u>n</u> eighbor of <u>B</u> RCA1 gene <u>2</u>)
NBS	<u>N</u> ijmegen <u>b</u> reakage <u>s</u> yndrom
NCCN	<u>N</u> ational <u>C</u> omprehensive <u>C</u> ancer <u>N</u> etwork
NGS	<u>n</u> ext-generation <u>s</u> equencing
NHEJ	nehomologní spojování konců (<u>n</u> on <u>h</u> omologous <u>e</u> nd <u>j</u> oining)
NHL	<u>n</u> on- <u>h</u> odgkinský lymfom
NLS	jaderný lokalizační signál (<u>n</u> uclear <u>l</u> ocalization <u>s</u> ignal)
NMR	nukleární magnetická resonance (<u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance)
NOS	blíže nespecifikovaný (<u>n</u> ot <u>o</u> therwise <u>s</u> pecified)
OCCR	<u>o</u> varian <u>c</u> ancer <u>c</u> luster <u>r</u> egions
OMIM	<u>O</u> nline <u>M</u> endelian <u>I</u> nheritance in <u>M</u> an
OR	<u>o</u> dds <u>r</u> atio
OS	celkové přežití (<u>o</u> verall <u>s</u> urvival)
p	hodnota p
p53	protein p53
PAI/1	urokinázový typ aktivátoru plazminogenu
<i>PALB2</i>	gen <i>PALB2</i> (<u>P</u> artner and <u>L</u> ocaliser of <u>B</u> RCA <u>2</u>)
PARP	poly-(<u>A</u> DP- <u>r</u> ibózo) polymeráza
PCR	polymerázová řetězová reakce (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PET/CT	diagnostická zobrazovací metoda spojující vyšetření počítačovou tomografií (<u>c</u> omputed <u>t</u> omography) a pozitron emisní tomografií
PR	progesteronový receptor
<i>PTEN</i>	gen <i>PTEN</i> (<u>p</u> hosphatase and <u>t</u> ensin homolog)
PTT	test zkrácení proteinu (<u>p</u> rotein <u>t</u> runcation <u>t</u> est [“] ,)
<i>RAD50</i>	gen <i>RAD50</i>
<i>RAD51</i>	gen <i>RAD51</i>
<i>RAD51C</i>	gen <i>RAD51C</i>
<i>RAD51D</i>	gen <i>RAD51D</i>
<i>ras</i>	<u>r</u> at <u>s</u> arcoma oncogene
Rb	<u>r</u> etinoblastom
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (<u>r</u> estriction <u>f</u> ragment <u>l</u> ength <u>p</u> olymorphism)
RING	<u>R</u> eally <u>I</u> nteresting <u>N</u> ew <u>G</u> ene
RNA	kyselina ribonukleová (<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid)
RPA	<u>r</u> eplication <u>p</u> rotein <u>A</u>
RR	<u>r</u> elativní <u>r</u> iziko
SCD	<u>s</u> tromalin <u>c</u> onservative <u>d</u> omain
SDS	dodecylsírán sodný (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SLG	<u>S</u> polečnost <u>L</u> ékařské <u>G</u> enetiky
SNP	bodový polymorfismus (<u>s</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphism)
ssDNA	jednořetězová kyselina deoxyribonukleová (<u>s</u> ingle <u>s</u> tranded <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
T	<u>t</u> hymin
TAFs	<u>T</u> BP-associated <u>f</u> actors

TBP	<u>T</u> ATA <u>b</u> ox-binding <u>p</u> rotein
TDLU	terminální duktolobulární jednotka (<u>t</u> ermin <u>a</u> l <u>d</u> ucto- <u>l</u> obular <u>u</u> nit)
<i>TGFβ1</i>	gen <i>TGFβ1</i> (<u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor, <u>b</u> eta <u>1</u>)
T _m	teplota tání (<u>m</u> elting <u>t</u> emperature)
TNM	klasifikace nádorů podle tumoru, uzlin a metastáz (<u>t</u> umor, <u>n</u> odi, <u>m</u> etastasis)
<i>TP53</i>	gen <i>TP53</i> (tumor protein <u>p</u> 53)
uPA	urokinázový aktivátor plazminogenu (<u>u</u> rokinase <u>p</u> lasminogen <u>a</u> ctivator)
UZ	<u>u</u> ltrazvukové vyšetření
ÚZIS	<u>Ú</u> stav <u>z</u> dravotnických <u>i</u> nformací a <u>s</u> tistiky
VUS	varianty nejasného významu (<u>v</u> ariants of <u>u</u> ncertain <u>s</u> ignificance)
WHO	Světová zdravotnická organizace (<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization)
ZN	zhoubný <u>n</u> ovotvar

Seznam obrázků

Číslo	Název obrázku	Strana
1	Anatomie prsu	4
2	Graf vývoje incidence a mortality nádorů prsu v České republice	8
3	Graf časového vývoje indexu mortalita/incidence pro karcinom prsu u žen v České republice	9
4	Graf vývoje zastoupení klinických stadií v době diagnózy karcinomu prsu u žen v České republice	9
5	Umístění genu <i>BRCA1</i> na chromozomu 17	17
6	Schéma duplikované oblasti chromozomu	18
7	Uspořádání interakčních domén proteinu <i>BRCA1</i>	19
8	Schematické zobrazení interakcí proteinů v rámci <i>BASC</i>	20
9	Umístění genu <i>BRCA2</i> na chromozomu 13	21
10	Uspořádání interakčních domén proteinu <i>BRCA1</i>	22
11	Schematické znázornění domén a vazebních motivů v proteinu <i>NBN</i>	24
12	Schéma zapojení proteinu <i>NBN</i> do procesu homologní rekombinace	25
13	Schéma interakcí proteinů asociovaných se zvýšeným rizikem vzniku hereditárního karcinomu prsu	33
14	Schéma genu <i>NBN</i> (<i>NBS1</i>), jeho nezkráceného proteinového produktu a dvou proteinových fragmentů, které vznikají na základě delece 657del5	35
15	Genetické alterace predisponující ke karcinomu prsu	36
16	Elektroforéza znázorňující dělení PCR produktů vzniklých štěpením restriční endonukleázou <i>DdeI</i>	50
17	Znázornění spreadexových gelů při dělení štěpného produktu vzniklého působením <i>Cfr13I</i>	51
18	Schematické znázornění fragmentů použitých při <i>PTT</i> v exonu 11 genu <i>BRCA 1</i>	52
19	<i>PTT</i> fragmentu B	53
20	Obraz sledovaných mutací při analýze denaturační vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	54
21	Obraz sledovaných mutací – negativní první derivace křivek tání - při vysokorozlišovací analýze křivek tání (<i>HRMA</i>)	55
22	Potvrzení mutací 5382insC a 300T>G v exonu 5 v exonu genu <i>BRCA1</i> sekvenováním	56
23	Potvrzení mutací 1806C>T v exonu 11 genu <i>BRCA1</i> a 5873C>A v exonu 11 genu <i>BRCA2</i>	56
24	Potvrzení mutací 657del5 a c.643C>T (R215W) v exonu 6 genu <i>NBN</i> sekvenováním	56
25	Metaanalýza stanovující asociaci nosičství mutace 657del5 v genu <i>NBN</i> s rizikem vzniku karcinomu prsu	71
26	Metaanalýza stanovující asociaci nosičství mutace 657del5 v genu <i>NBN</i> s rizikem vzniku nádorového onemocnění	72
27	Metaanalýza stanovující asociaci nosičství mutace R215W v genu <i>NBN</i> s rizikem vzniku nádorového onemocnění	72

Seznam tabulek

Číslo	Název tabulky	Strana
1	Klasifikace typů karcinomu prsu podle profilů genové exprese	8
2	Karcinom prsu, klasifikace TNM	14
3	Karcinom prsu, rozdělení do stadií (staging)	15
4	Spektrum bodových mutací a krátkých delecí a inzercí v genu <i>BRCA1</i> detekovaných u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovárií	29
5	Spektrum bodových mutací a krátkých delecí a inzercí v genu <i>BRCA2</i> detekovaných u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovárií	30
6	Rozsáhlé přestavby v genu <i>BRCA1</i> identifikované u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovárií	30
7	Spektrum mutací v genu <i>ATM</i> detekovaných u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovárií	34
8	Nejčastější mutace v genu <i>CHEK2</i> detekované u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovárií	34
9	Spektrum mutací v genu <i>TP53</i> detekovaných u českých pacientů s vysokým rizikem hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovárií	34
10	Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovárií, charakteristické znaky	37
11	Charakteristické znaky patogenních mutací dle EMQN	39
12	Indikační kritéria ke genetickému vyšetření	41
13	Priméry použité pro prescreening rekurentní mutace c.5385insC v genu <i>BRCA 1</i>	50
14	Priméry použité pro prescreening rekurentní mutace c. 300T>G v genu <i>BRCA 1</i>	51
15	Priméry použité pro prescreening rekurentních mutací v exonu 11 genu <i>BRCA 1</i>	53
16	Priméry použité pro prescreening rekurentních mutací ve fragmentu exonu 11 genu <i>BRCA 2</i>	54
17	Priméry použité pro prescreening mutací v exonu 6 genu <i>NBN</i>	55
18	Rekurentní mutace zachycené v genech <i>BRCA1</i> a <i>BRCA2</i>	60
19	Mutace zachycené v genu <i>NBN</i>	61
20	Porovnání klinických charakteristik nosiček mutací v genu <i>BRCA1/2</i> a pacientek bez mutace	63
21	Nosiči mutace v genu <i>NBN</i> ze skupiny vysoce rizikových pacientů s karcinomem prsu a/nebo ovárií	64

Použitá literatura

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. www.svod.cz.
3. Abrahamova, J.e.a., *Atlas nádorů prsu*. 2000, Praha: Grada.
4. Hindle, W.H., *Breast Care: A Clinical Guidebook for Women's Primary Health Care Providers*. 1999, New York, NY: Springer-Verlag.
5. Lakhani S, E.I., Schnitt S, et al., *WHO Classification of Tumours of the Breast*. Vol. 4. 2012, Lyon: IARC Press.
6. Abrahamova, J., *Současné možnosti léčby karcinomu*. Remedia on-line, 2002. **4**.
7. Turashvili, G., et al., *Differentiation of tumours of ductal and lobular origin: I. Proteomics of invasive ductal and lobular breast carcinomas*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2005. **149**(1): p. 57-62.
8. Turashvili, G., et al., *Novel immunohistochemical markers for the differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2007. **151**(1): p. 59-64.
9. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 2002. **41**(3A): p. 154-61.
10. Osborne, C.K., *Steroid hormone receptors in breast cancer management*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **51**(3): p. 227-38.
11. Purdie, C.A., et al., *Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study*. Br J Cancer, 2013. **110**(3): p. 565-72.
12. Pegram, M.D., G. Konecny, and D.J. Slamon, *The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer*. Cancer Treat Res, 2000. **103**: p. 57-75.
13. Harbeck, N., et al., *HER2 Dimerization Inhibitor Pertuzumab - Mode of Action and Clinical Data in Breast Cancer*. Breast Care (Basel), 2014. **8**(1): p. 49-55.
14. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
15. Ryška, A., *Vybrané novinky v diagnostice a klasifikaci invazivního karcinomu prsu*. Farmakoterapie. Biologická léčba karcinomu prsu. Speciální příloha, 2008.
16. DeSantis, C., et al., *Breast cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2013. **64**(1): p. 52-62.
17. *Zdravotnická ročenka České republiky*. 2013: ÚZIS ČR.
18. Kelsey, J.L. and P.L. Horn-Ross, *Breast cancer: magnitude of the problem and descriptive epidemiology*. Epidemiol Rev, 1993. **15**(1): p. 7-16.
19. Taneja, P., et al., *Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance*. Clin Med Insights Oncol, 2010. **4**: p. 15-34.
20. Slamon, D.J., et al., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science, 1989. **244**(4905): p. 707-12.
21. Atalay, G., et al., *Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer*. Ann Oncol, 2003. **14**(9): p. 1346-63.
22. *Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease*. Lancet, 2001. **358**(9291): p. 1389-99.

23. *Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet, 1997. 349(9064): p. 1505-10.*
24. Pohlreich, P., et al., *Klinický význam analýz genu středního rizika pro hodnocení rizika vzniku karcinomu prsu a dalších nádorů. Klin Onkol, 2012. 25 Suppl: p. S59-66.*
25. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. 68(4): p. 820-3.*
26. Ticha, I., et al., *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. 124(2): p. 337-47.*
27. Esteller, M., et al., *A gene hypermethylation profile of human cancer. Cancer Res, 2001. 61(8): p. 3225-9.*
28. Loman, N., et al., *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, 2001. 93(16): p. 1215-23.*
29. Mocci, E., et al., *Risk of pancreatic cancer in breast cancer families from the breast cancer family registry. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013. 22(5): p. 803-11.*
30. Phelan, C.M., et al., *Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. Br J Cancer, 2013. 110(2): p. 530-4.*
31. Castro, E. and R. Eeles, *The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. Asian J Androl, 2014. 14(3): p. 409-14.*
32. Oldenburg, R.A., et al., *Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? Crit Rev Oncol Hematol, 2007. 63(2): p. 125-49.*
33. Couch, F.J., K.L. Nathanson, and K. Offit, *Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. Science, 2014. 343(6178): p. 1466-70.*
34. Kam, J.K., et al., *Five-year analysis of magnetic resonance imaging as a screening tool in women at hereditary risk of breast cancer. J Med Imaging Radiat Oncol, 2013. 57(4): p. 400-6.*
35. Majek, O., et al., *Breast cancer screening in the Czech Republic: time trends in performance indicators during the first seven years of the organised programme. BMC Public Health, 2011. 11: p. 288.*
36. Danes, J., Bartonkova, H., Skovajsova, M., Dusek, L. et al., *Oficiální výsledky Národního programu mamografického screeningu v roce 2012. <http://www.mamo.cz/>, 2013.*
37. *The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. Lancet. 380(9855): p. 1778-86.*
38. Miller, A.B., et al., *Twenty five year follow-up for breast cancer incidence and mortality of the Canadian National Breast Screening Study: randomised screening trial. BMJ, 2014. 348: p. g366.*
39. Rogers, C.E., et al., *Molecular prognostic indicators in breast cancer. Eur J Surg Oncol, 2002. 28(5): p. 467-78.*
40. Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, Ch., *TNM klasifikace zhoubných novotvarů, 7. vydání. 2011, Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky.*
41. Bradley, K.T., *Prognostic and predictive factors in breast cancer. NewsPath® Sept 2007; College of American Pathologists' monthly article series, 2007.*

42. Hlatky, L., P. Hahnfeldt, and J. Folkman, *Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(12): p. 883-93.
43. Sotiriou, C. and L. Pusztai, *Gene-expression signatures in breast cancer*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 790-800.
44. Goldhirsch, A., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. Ann Oncol, 2011. **22**(8): p. 1736-47.
45. Reinbolt, R.E. and J.L. Hays, *The Role of PARP Inhibitors in the Treatment of Gynecologic Malignancies*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 237.
46. Hall, J.M., et al., *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. Science, 1990. **250**(4988): p. 1684-9.
47. Miki, Y., et al., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
48. <http://ghr.nlm.nih.gov>.
49. Smith, T.M., et al., *Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1*. Genome Res, 1996. **6**(11): p. 1029-49.
50. Xu, C.F., et al., *Isolation and characterisation of the NBR2 gene which lies head to head with the human BRCA1 gene*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(7): p. 1057-62.
51. Brown, M.A., et al., *The 5' end of the BRCA1 gene lies within a duplicated region of human chromosome 17q21*. Oncogene, 1996. **12**(12): p. 2507-13.
52. Puget, N., et al., *Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(4): p. 858-65.
53. Roy, R., J. Chun, and S.N. Powell, *BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection*. Nat Rev Cancer, 2011. **12**(1): p. 68-78.
54. Hashizume, R., et al., *The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14537-40.
55. Ekblad, C.M., et al., *Characterisation of the BRCT domains of the breast cancer susceptibility gene product BRCA1*. J Mol Biol, 2002. **320**(3): p. 431-42.
56. Zhang, F., et al., *PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response*. Curr Biol, 2009. **19**(6): p. 524-9.
57. Sy, S.M., M.S. Huen, and J. Chen, *PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 7155-60.
58. Mark, W.Y., et al., *Characterization of segments from the central region of BRCA1: an intrinsically disordered scaffold for multiple protein-protein and protein-DNA interactions?* J Mol Biol, 2005. **345**(2): p. 275-87.
59. Wang, Y., et al., *BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures*. Genes Dev, 2000. **14**(8): p. 927-39.
60. Hickson, I.D., *RecQ helicases: caretakers of the genome*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 169-78.
61. Deng, C.X. and S.G. Brodie, *Roles of BRCA1 and its interacting proteins*. Bioessays, 2000. **22**(8): p. 728-37.
62. Starita, L.M. and J.D. Parvin, *The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(3): p. 345-50.
63. Ye, Q., et al., *BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations*. J Cell Biol, 2001. **155**(6): p. 911-21.

64. Xu, B., S. Kim, and M.B. Kastan, *Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(10): p. 3445-50.
65. Huen, M.S., S.M. Sy, and J. Chen, *BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(2): p. 138-48.
66. Durant, S.T. and J.A. Nickoloff, *Good timing in the cell cycle for precise DNA repair by BRCA1*. Cell Cycle, 2005. **4**(9): p. 1216-22.
67. Sonoda, E., et al., *Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(9-10): p. 1021-9.
68. Moynahan, M.E. and M. Jasin, *Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 196-207.
69. Kastan, M.B. and D.S. Lim, *The many substrates and functions of ATM*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(3): p. 179-86.
70. Wooster, R., et al., *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 789-92.
71. Tavtigian, S.V., et al., *The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 333-7.
72. Venkitaraman, A.R., *Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2*. Cell, 2002. **108**(2): p. 171-82.
73. Heczko, M., et al., *Hodnocení variant nejasného významu v genu BRCA2*. Klin Onkol, 2012. **25 Suppl**: p. S87-95.
74. Benchimol, S., et al., *Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17*. Somat Cell Mol Genet, 1985. **11**(5): p. 505-10.
75. Isobe, M., et al., *Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13*. Nature, 1986. **320**(6057): p. 84-5.
76. May, P. and E. May, *Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein*. Oncogene, 1999. **18**(53): p. 7621-36.
77. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
78. Miyashita, T. and J.C. Reed, *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene*. Cell, 1995. **80**(2): p. 293-9.
79. Matsuoka, S., M. Huang, and S.J. Elledge, *Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase*. Science, 1998. **282**(5395): p. 1893-7.
80. Prokopcova, J., et al., *The role of ATM in breast cancer development*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **104**(2): p. 121-8.
81. Bartek, J. and J. Lukas, *Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer*. Cancer Cell, 2003. **3**(5): p. 421-9.
82. Nevanlinna, H. and J. Bartek, *The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility*. Oncogene, 2006. **25**(43): p. 5912-9.
83. Thompson, D., et al., *A multicenter study of cancer incidence in CHEK2 1100delC mutation carriers*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(12): p. 2542-5.
84. Gatti, R.A., et al., *Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23*. Nature, 1988. **336**(6199): p. 577-80.
85. Uziel, T., et al., *Genomic Organization of the ATM gene*. Genomics, 1996. **33**(2): p. 317-20.
86. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. Nature, 2003. **421**(6922): p. 499-506.
87. Gumy-Pause, F., P. Wacker, and A.P. Sappino, *ATM gene and lymphoid malignancies*. Leukemia, 2004. **18**(2): p. 238-42.

88. Renwick, A., et al., *ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles*. Nat Genet, 2006. **38**(8): p. 873-5.
89. Saar, K., et al., *The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(3): p. 605-10.
90. Varon, R., et al., *Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome*. Cell, 1998. **93**(3): p. 467-76.
91. Mohammad, D.H. and M.B. Yaffe, *14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(9): p. 1009-17.
92. Tauchi, H., *Positional cloning and functional analysis of the gene responsible for Nijmegen breakage syndrome, NBS1*. J Radiat Res, 2000. **41**(1): p. 9-17.
93. Falck, J., J. Coates, and S.P. Jackson, *Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 605-11.
94. Desai-Mehta, A., K.M. Cerosaletti, and P. Concannon, *Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 2184-91.
95. Demuth, I. and M. Digweed, *The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome*. Oncogene, 2007. **26**(56): p. 7792-8.
96. Schiller, C.B., et al., *Structure of Mre11-Nbs1 complex yields insights into ataxia-telangiectasia-like disease mutations and DNA damage signaling*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(7): p. 693-700.
97. Brugmans, L., et al., *NBS1 cooperates with homologous recombination to counteract chromosome breakage during replication*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(12): p. 1363-70.
98. Saito, Y., Fujimoto, H., Kobayashi, J., *Role of NBS1 in DNA damage response and its relationship with cancer development*. Transl Cancer Res, 2013. **2**(3): p. 178-189.
99. Williams, R.S., et al., *Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair*. Cell, 2009. **139**(1): p. 87-99.
100. Kobayashi, J., et al., *NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain*. Curr Biol, 2002. **12**(21): p. 1846-51.
101. Zhu, X.D., et al., *Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 347-52.
102. Stiff, T., et al., *Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events*. EMBO J, 2005. **24**(1): p. 199-208.
103. Seemanova, E., et al., *Zvýšené riziko malignit u heterozygotů v rodinách pacientů s Nijmegen breakage syndromem*. Cas Lek Cesk, 2006. **145**(2): p. 138-43.
104. di Masi, A. and A. Antoccia, *NBS1 Heterozygosity and Cancer Risk*. Curr Genomics, 2008. **9**(4): p. 275-81.
105. Chrzanowska, K.H., et al., *Nijmegen breakage syndrome (NBS)*. Orphanet J Rare Dis, 2012. **7**: p. 13.
106. Matsuura, S., et al., *Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 179-81.
107. Varon, R., et al., *Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations*. Eur J Hum Genet, 2000. **8**(11): p. 900-2.
108. Glozak, M.A. and E. Seto, *Histone deacetylases and cancer*. Oncogene, 2007. **26**(37): p. 5420-32.
109. Wilcox, C.B., et al., *High-resolution methylation analysis of the BRCA1 promoter in ovarian tumors*. Cancer Genet Cytogenet, 2005. **159**(2): p. 114-22.

110. Sluiter, M.D. and E.J. van Rensburg, *Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **125**(2): p. 325-49.
111. <http://agvgd.iarc.fr/>.
112. Lindor, N.M., et al., *A review of a multifactorial probability-based model for classification of BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance (VUS)*. Hum Mutat, 2011. **33**(1): p. 8-21.
113. Claus, E.B., et al., *The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer*. Cancer, 1996. **77**(11): p. 2318-24.
114. Zhang, S., et al., *Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2011. **121**(2): p. 353-7.
115. Frank, T.S., et al., *Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals*. J Clin Oncol, 2002. **20**(6): p. 1480-90.
116. <https://research.nhgri.nih.gov/bic/>.
117. Futreal, P.A., et al., *BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas*. Science, 1994. **266**(5182): p. 120-2.
118. Guidugli, L., et al., *Functional assays for analysis of variants of uncertain significance in BRCA2*. Hum Mutat, 2013. **35**(2): p. 151-64.
119. Thompson, D. and D. Easton, *The genetic epidemiology of breast cancer genes*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004. **9**(3): p. 221-36.
120. Judkins, T., et al., *Clinical significance of large rearrangements in BRCA1 and BRCA2*. Cancer, 2012. **118**(21): p. 5210-6.
121. Petrucelli, N., M.B. Daly, and G.L. Feldman, *Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2*. Genet Med, 2010. **12**(5): p. 245-59.
122. Szabo, C.I. and M.C. King, *Population genetics of BRCA1 and BRCA2*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(5): p. 1013-20.
123. Roa, B.B., et al., *Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2*. Nat Genet, 1996. **14**(2): p. 185-7.
124. Offit, K., et al., *Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer*. Lancet, 1996. **347**(9016): p. 1643-5.
125. Johannesdottir, G., et al., *High prevalence of the 999del5 mutation in icelandic breast and ovarian cancer patients*. Cancer Res, 1996. **56**(16): p. 3663-5.
126. Weitzel, J.N., et al., *Prevalence and type of BRCA mutations in Hispanics undergoing genetic cancer risk assessment in the southwestern United States: a report from the Clinical Cancer Genetics Community Research Network*. J Clin Oncol, 2012. **31**(2): p. 210-6.
127. Gronwald, J., et al., *Direct-to-patient BRCA1 testing: the Twoj Styl experience*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **100**(3): p. 239-45.
128. Gorski, B., et al., *A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families*. Int J Cancer, 2004. **110**(5): p. 683-6.
129. Wagner, T.M., et al., *BRCA1-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific BRCA1 mutations and pathological characteristics*. Int J Cancer, 1998. **77**(3): p. 354-60.
130. Ciernikova, S., et al., *Ashkenazi founder BRCA1/BRCA2 mutations in Slovak hereditary breast and/or ovarian cancer families*. Neoplasma, 2006. **53**(2): p. 97-102.
131. Gayther, S.A., et al., *Frequently occurring germ-line mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer families from Russia*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(5): p. 1239-42.

132. Machackova, E., et al., *Spectrum and characterisation of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 140.
133. Pohlreich, P., et al., *High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area*. Breast Cancer Res, 2005. **7**(5): p. R728-36.
134. Backe, J., et al., *Frequency of BRCA1 mutation 5382insC in German breast cancer patients*. Gynecol Oncol, 1999. **72**(3): p. 402-6.
135. Pohlreich, P., Stribrna, J., Ticha, I., Soukupova, J., Kleibl, Z., Zikan, M., Zimovjanova, M., Kotlas, J., Panczak, A., *Predisposing genes in hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic*. EJC Supplements 8:16., 2010.
136. Vasickova, P., et al., *High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangements in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic*. BMC Med Genet, 2007. **8**: p. 32.
137. <http://seer.cancer.gov/>.
138. Antoniou, A., et al., *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(5): p. 1117-30.
139. Milne, R.L., et al., *The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(9): p. 2861-9.
140. Chen, S. and G. Parmigiani, *Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance*. J Clin Oncol, 2007. **25**(11): p. 1329-33.
141. Mavaddat, N., et al., *Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA)*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011. **21**(1): p. 134-47.
142. Friebel, T.M., S.M. Domchek, and T.R. Rebbeck, *Modifiers of Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Systematic Review and Meta-Analysis*. J Natl Cancer Inst, 2014.
143. Antoniou, A.C., et al., *Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction*. Cancer Res, 2010. **70**(23): p. 9742-54.
144. Rebbeck, T.R., et al., *Modification of BRCA1-Associated Breast and Ovarian Cancer Risk by BRCA1-Interacting Genes*. Cancer Res, 2011. **71**(17): p. 5792-805.
145. Wang, X., et al., *Common variants associated with breast cancer in genome-wide association studies are modifiers of breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(14): p. 2886-97.
146. Couch, F.J., et al., *Genome-wide association study in BRCA1 mutation carriers identifies novel loci associated with breast and ovarian cancer risk*. PLoS Genet, 2013. **9**(3): p. e1003212.
147. Eerola, H., et al., *Relationship of patients' age to histopathological features of breast tumours in BRCA1 and BRCA2 and mutation-negative breast cancer families*. Breast Cancer Res, 2005. **7**(4): p. R465-9.
148. Lakhani, S.R., et al., *Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(15): p. 1138-45.
149. van der Groep, P., et al., *High frequency of HIF-1alpha overexpression in BRCA1 related breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **111**(3): p. 475-80.
150. Palacios, J., et al., *Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations:*

- differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(10 Pt 1): p. 3606-14.
151. van der Groep, P., E. van der Wall, and P.J. van Diest, *Pathology of hereditary breast cancer.* Cell Oncol (Dordr), 2011. **34**(2): p. 71-88.
 152. Lakhani, S.R., et al., *Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(14): p. 5175-80.
 153. Kriege, M., et al., *Distant disease-free interval, site of first relapse and post-relapse survival in BRCA1- and BRCA2-associated compared to sporadic breast cancer patients.* Breast Cancer Res Treat, 2008. **111**(2): p. 303-11.
 154. Rennert, G., et al., *Clinical outcomes of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations.* N Engl J Med, 2007. **357**(2): p. 115-23.
 155. Bane, A.L., et al., *BRCA2 mutation-associated breast cancers exhibit a distinguishing phenotype based on morphology and molecular profiles from tissue microarrays.* Am J Surg Pathol, 2007. **31**(1): p. 121-8.
 156. Lakhani, S.R., et al., *The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2.* J Clin Oncol, 2002. **20**(9): p. 2310-8.
 157. Bane, A.L., et al., *Expression profiling of familial breast cancers demonstrates higher expression of FGFR2 in BRCA2-associated tumors.* Breast Cancer Res Treat, 2009. **117**(1): p. 183-91.
 158. Walsh, T. and M.C. King, *Ten genes for inherited breast cancer.* Cancer Cell, 2007. **11**(2): p. 103-5.
 159. Walsh, T., et al., *Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(44): p. 18032-7.
 160. Soukupova, J., et al., *Contribution of mutations in ATM to breast cancer development in the Czech population.* Oncol Rep, 2008. **19**(6): p. 1505-10.
 161. Kleibl, Z., et al., *The CHEK2 c.1100delC germline mutation rarely contributes to breast cancer development in the Czech Republic.* Breast Cancer Res Treat, 2005. **90**(2): p. 165-7.
 162. Ticha, I., *Genetické faktory odpovědné za vývoj dědičného karcinomu prsu a ovaria. Rozsáhlé přestavby v genech BRCA1 a BRCA2.* . Dizertační práce, Karlova univerzita, 1. lékařská fakulta. Vedoucí práce Petr Pohlreich, 2010.
 163. Berardinelli, F., A. di Masi, and A. Antocchia, *NBN Gene Polymorphisms and Cancer Susceptibility: A Systemic Review.* Curr Genomics, 2014. **14**(7): p. 425-40.
 164. Steffen, J., et al., *Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland.* Int J Cancer, 2004. **111**(1): p. 67-71.
 165. Seemanova, E., et al., *Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation.* J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(24): p. 1875-80.
 166. Debniak, T., et al., *Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in patients with malignant melanoma of the skin.* Melanoma Res, 2003. **13**(4): p. 365-70.
 167. Chrzanowska, K.H., et al., *Carrier frequency of mutation 657del5 in the NBS1 gene in a population of Polish pediatric patients with sporadic lymphoid malignancies.* Int J Cancer, 2006. **118**(5): p. 1269-74.
 168. Cerosaletti, K.M., et al., *Mutations and molecular variants of the NBS1 gene in non-Hodgkin lymphoma.* Genes Chromosomes Cancer, 2002. **35**(3): p. 282-6.
 169. Roznowski, K., et al., *I171V germline mutation in the NBS1 gene significantly increases risk of breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2008. **110**(2): p. 343-8.

170. Maser, R.S., R. Zinkel, and J.H. Petrini, *An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele*. *Nat Genet*, 2001. **27**(4): p. 417-21.
171. Seemanova, E., et al., *Nijmegen breakage syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability*. *J Med Genet*, 2006. **43**(3): p. 218-24.
172. Bogdanova, N., et al., *Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(4): p. 802-6.
173. Schroder-Heurich, B., et al., *Functional deficiency of NBN, the Nijmegen breakage syndrome protein, in a p.R215W mutant breast cancer cell line*. *BMC Cancer*, 2014. **14**(1): p. 434.
174. Gorski, B., et al., *Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients*. *Int J Cancer*, 2003. **106**(3): p. 379-81.
175. Steffen, J., et al., *Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(2): p. 472-5.
176. Michailidou, K., et al., *Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk*. *Nat Genet*, 2013. **45**(4): p. 353-61, 361e1-2.
177. Maxwell, K.N. and K.L. Nathanson, *Common breast cancer risk variants in the post-COGS era: a comprehensive review*. *Breast Cancer Res*, 2013. **15**(6): p. 212.
178. Berliner, J.L. and A.M. Fay, *Risk assessment and genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer: recommendations of the National Society of Genetic Counselors*. *J Genet Couns*, 2007. **16**(3): p. 241-60.
179. Berliner, J.L., et al., *NSGC practice guideline: risk assessment and genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer*. *J Genet Couns*, 2012. **22**(2): p. 155-63.
180. <http://www.nccn.org/>, *Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, version 1.2014*.
181. Plevova, P., et al., *Syndrom hereditárneho karcinomu prsu a ovarií*. *Klin Onkol*, 2009. **22 Suppl**: p. S8-11.
182. Powers, J. and J.E. Stopfer, *Risk assessment, genetic counseling, and clinical care for hereditary breast cancer*. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 2014. **43**(3): p. 361-73.
183. Bartoňková H., F.L., Helmichová E., Kalábová R., Kleibl Z., Konopásek B., Krutilková V., Macháčková E., Novotný J., Petráková K., Petruželka L., Plevová P., Pohlreich P., Rob L., Skovajsová M., Veselý J., Žaloudík J., *Doporučené zásady péče o nemocné s nádory prsu a vaječníků a zdravé osoby se zárodečnými mutacemi genů BRCA1 nebo BRCA2*. *Klinická onkologie*, 2003. **16**: p. 28-33.
184. Foretová, L., Macháčková, E., *Doporučení SLG: Dědičný syndrom nádoru prsu a/nebo ovaria, molekulární analýza BRCA1 a BRCA2 genů*. <http://www.slg.cz/2012/spravna-laboratorni-praxe>, 2007.
185. *EMQN (2013) Guidelines for hereditary breast and ovarian cancer*. <http://www.emqn.org>.
186. <https://research.cchmc.org/LOVD2>.
187. Plon, S.E., et al., *Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results*. *Hum Mutat*, 2008. **29**(11): p. 1282-91.
188. Claus, E.B., N. Risch, and W.D. Thompson, *The calculation of breast cancer risk for women with a first degree family history of ovarian cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 1993. **28**(2): p. 115-20.

189. Gail, M.H., et al., *Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(24): p. 1879-86.
190. Novotny, J., et al., *Breast cancer risk assessment in the Czech female population--an adjustment of the original Gail model*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **95**(1): p. 29-35.
191. Parmigiani, G., D. Berry, and O. Aguilar, *Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes BRCA1 and BRCA2*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(1): p. 145-58.
192. Berry, D.A., et al., *Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(3): p. 227-38.
193. Tyrer, J., S.W. Duffy, and J. Cuzick, *A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors*. Stat Med, 2004. **23**(7): p. 1111-30.
194. Antoniou, A.C., et al., *The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer*. Br J Cancer, 2004. **91**(8): p. 1580-90.
195. Lindor, N.M., et al., *Predicting BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers: comparison of PENN II model to previous study*. Fam Cancer, 2010. **9**(4): p. 495-502.
196. Balmana, J., et al., *BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines*. Ann Oncol, 2011. **22 Suppl 6**: p. vi31-4.
197. Robson, M. and K. Offit, *Clinical practice. Management of an inherited predisposition to breast cancer*. N Engl J Med, 2007. **357**(2): p. 154-62.
198. Obdeijn, I.M., et al., *Should we screen BRCA1 mutation carriers only with MRI? A multicenter study*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **144**(3): p. 577-82.
199. Pataky, R., et al., *Cost-effectiveness of MRI for breast cancer screening in BRCA1/2 mutation carriers*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 339.
200. Hermsen, B.B., et al., *No efficacy of annual gynaecological screening in BRCA1/2 mutation carriers; an observational follow-up study*. Br J Cancer, 2007. **96**(9): p. 1335-42.
201. Eisen, A., et al., *Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study*. J Clin Oncol, 2005. **23**(30): p. 7491-6.
202. King, M.C., et al., *Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial*. JAMA, 2001. **286**(18): p. 2251-6.
203. Gronwald, J., et al., *Tamoxifen and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers: an update*. Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2281-4.
204. Zimovjanova, M., *Hereditárni karcinom prsu*. Onkologie, 2009. **3**(6): p. 348-350.
205. Clark, A.S. and S.M. Domchek, *Clinical management of hereditary breast cancer syndromes*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2011. **16**(1): p. 17-25.
206. Robson, M.E., *Treatment of hereditary breast cancer*. Semin Oncol, 2007. **34**(5): p. 384-91.
207. Farmer, H., et al., *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 917-21.
208. De Lorenzo, S.B., et al., *The Elephant and the Blind Men: Making Sense of PARP Inhibitors in Homologous Recombination Deficient Tumor Cells*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 228.
209. Lord, C.J. and A. Ashworth, *Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1381-8.

210. Dever, S.M., et al., *BRCA1-directed, enhanced and aberrant homologous recombination: mechanism and potential treatment strategies*. Cell Cycle, 2012. **11**(4): p. 687-94.
211. Bora, R.S., et al., *RNA interference therapeutics for cancer: challenges and opportunities (review)*. Mol Med Rep, 2012. **6**(1): p. 9-15.
212. Smith, E.C., *An overview of hereditary breast and ovarian cancer syndrome*. J Midwifery Womens Health, 2012. **57**(6): p. 577-84.
213. Kean, S., *Breast cancer. The 'other' breast cancer genes*. Science, 2014. **343**(6178): p. 1457-9.
214. Domchek, S.M., et al., *Multiplex genetic testing for cancer susceptibility: out on the high wire without a net?* J Clin Oncol, 2013. **31**(10): p. 1267-70.
215. Kleibl, Z., et al., *Analysis of CHEK2 FHA domain in Czech patients with sporadic breast cancer revealed distinct rare genetic alterations*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **112**(1): p. 159-64.
216. Zikan, M., P. Pohlreich, and J. Stribrna, *Mutational analysis of the BRCA1 gene in 30 Czech ovarian cancer patients*. J Genet, 2005. **84**(1): p. 63-7.
217. Zhang, Z.H., et al., *Current evidence on the relationship between two polymorphisms in the NBS1 gene and breast cancer risk: a meta-analysis*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **13**(11): p. 5375-9.
218. Syrjakoski, K., et al., *Population-based study of BRCA1 and BRCA2 mutations in 1035 unselected Finnish breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(18): p. 1529-31.
219. Moller, P., et al., *Genetic epidemiology of BRCA mutations--family history detects less than 50% of the mutation carriers*. Eur J Cancer, 2007. **43**(11): p. 1713-7.
220. Van Der Looij, M., et al., *Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary*. Int J Cancer, 2000. **86**(5): p. 737-40.
221. Lubinski, J., et al., *BRCA1-positive breast cancers in young women from Poland*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **99**(1): p. 71-6.
222. *Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases*. Anglian Breast Cancer Study Group. Br J Cancer, 2000. **83**(10): p. 1301-8.
223. Malone, K.E., et al., *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, 2006. **66**(16): p. 8297-308.
224. de Sanjose, S., et al., *Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in young breast cancer patients: a population-based study*. Int J Cancer, 2003. **106**(4): p. 588-93.
225. Friend, S.H. and E.E. Schadt, *Translational genomics. Clues from the resilient*. Science, 2014. **344**(6187): p. 970-2.
226. Shousha, S., *Medullary carcinoma of the breast and BRCA1 mutation*. Histopathology, 2000. **37**(2): p. 182-5.
227. Brenton, J.D., et al., *Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?* J Clin Oncol, 2005. **23**(29): p. 7350-60.
228. Eisinger, F., et al., *Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited*. Cancer Res, 1998. **58**(8): p. 1588-92.
229. <https://familyhistory.hhs.gov>.
230. Armel, S.R., et al., *The effectiveness of family history questionnaires in cancer genetic counseling*. J Genet Couns, 2009. **18**(4): p. 366-78.
231. Offit, K., *BRCA mutation frequency and penetrance: new data, old debate*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(23): p. 1675-7.

232. Metcalfe, K.A., et al., *Breast cancer risks in women with a family history of breast or ovarian cancer who have tested negative for a BRCA1 or BRCA2 mutation*. Br J Cancer, 2009. **100**(2): p. 421-5.
233. Gao, P., et al., *Functional variants in NBS1 and cancer risk: evidence from a meta-analysis of 60 publications with 111 individual studies*. Mutagenesis, 2013. **28**(6): p. 683-97.
234. Zhang, G., et al., *Significant association between Nijmegen breakage syndrome 1 657del5 polymorphism and breast cancer risk*. Tumour Biol, 2013. **34**(5): p. 2753-7.
235. Carlomagno, F., et al., *Determination of the frequency of the common 657Del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 1999. **25**(4): p. 393-5.

Seznam příloh

1. Mateju, M., et al., Population-based study of BRCA1/2 mutations: family history based criteria identify minority of mutation carriers. *Neoplasma*, 2010. 57(3): p. 280-5.

(5leté IF= 1,446)

2. Mateju, M., et al., Germline mutations 657del5 and 643C>T (R215W) in NBN are not likely to be associated with increased risk of breast cancer in Czech women. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. 133(2): p. 809-11.

(5leté IF= 4,467)

3. Ticha, I., et al., 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. 124(2): p. 337-47.

(5leté IF= 4,467)

Population-based study of BRCA1/2 mutations: Family history based criteria identify minority of mutation carriers

M. MATEJU^{1,2}, J. STRIBRNA¹, M. ZIKAN¹, Z. KLEIBL¹, M. JANATOVA¹, S. KORMUNDA², J. NOVOTNY³, P. SOUCEK³, L. PETRUZELKA³, P. POHLREICH^{1*}

1Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine, U Nemocnice 5, 128 53 Prague 2, Czech Republic, e-mail ppohl@1fl.cuni.cz; 2Department of Oncology, Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Prague; 3Laboratory of Toxicogenomics, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

Received August 5, 2009

The two major susceptibility genes, *BRCA1* and *BRCA2*, are involved in hereditary breast and ovarian cancer syndromes. Early detection of mutation carriers has crucial clinical importance, as it allows identification of women who may benefit from intensive clinical follow-up or prophylactic surgery. Generally accepted inclusion criteria for *BRCA1/2* mutation testing are based either upon family history of breast or ovarian cancer or young age at cancer diagnosis. To analyze the impact of *BRCA1/2* mutations on breast cancer development in the Czech population and to confront the clinical and histopathological data of mutation carriers with current criteria for mutation testing we examined the frequency of mutations in unselected breast cancer cases. Mutational analysis of *BRCA1/2* genes performed in 679 unselected female breast cancer patients included all recurrent deleterious alterations previously identified in the Prague area and truncating mutations in the whole exon 11 of *BRCA1*. Within analyzed gene sequences more than 80% of mutations were identified previously in high-risk patients. A total of 16 breast cancer patients (2.4%) carried a mutation. *BRCA1* mutations were identified in 14 (2.1%) whereas *BRCA2* in 2 (0.3%) women. Family history of ovarian cancer was a strong predictor of a *BRCA1/2* mutation (OR = 8.3; $p = 0.01$), however, family history of breast cancer was not indicative of carrier status. A significant association between medullary breast cancer and mutation status was observed. Current criteria for *BRCA1/2* mutation testing would distinguish only 6 out of 16 (37.5%) of carriers identified in our study. Ten breast cancer patients with confirmed *BRCA1/2* germ-line mutation exhibited no clinical characteristics that would predict their carrier status. Therefore, we believe that the testing for *BRCA1/2* mutations in the Czech Republic may not be restricted only to high-risk patients. Our results indicate that analysis of locally prevalent *BRCA1/2* mutations in all breast cancer patients might extend substantially the percentage of identified mutation carriers.

Keywords: hereditary breast cancer, BRCA/2 mutation analysis, population-based study

Breast cancer (BC) is the most common malignancy affecting women in developed countries. Genetic susceptibility resulting from germ-line inactivation in cancer predisposition genes accounts for approximately 5-10% of BC cases [1]. Hereditary BC is characterized by an early onset [2], high bilateral incidence and association with ovarian cancer (OC) [3]. Two highly penetrant cancer susceptibility genes, *BRCA1* (MIM # 113705) and *BRCA2* (MIM # 600185), have been identified [4, 5]. Mutations in these genes are responsible for more than 60% of diseases in families with BC only and for more than 90% of cases in families with both BC and OC [6]. Mutations in *BRCA1/2* confer a lifetime risk of BC that ranges between 60 and 85% and a risk of OC between 15 and 40% [7, 8]. Detection

of mutation carriers has an important clinical relevance, as it allows identification of women who may benefit from intensive clinical follow-up [9] or prophylactic surgery [10].

Analyses that have been performed in various geographic regions revealed significant differences in frequencies and types of mutations in *BRCA1/2* genes. Elucidation of recurrent population-specific mutations facilitates the analysis of high-risk patients in specific ethnic groups. Testing for three common mutations in *BRCA1* in Poland identified 198 (3.9%) carriers of 5024 women who had a first- or second-degree relative with BC before 50 years of age or OC at any age or women who themselves had such history of BC or OC [11]. In Iceland, the single *BRCA2* mutation 999del5 was respon-

sible for a substantial fraction (8.5%, 39/459) of BC patients [12]. The three frequently identified *BRCA1* and two *BRCA2* mutations accounted for 3.6% (18/500) of female BC patients in Hungary [13].

The *BRCA1* mutations 5382insC and 300T>G predominate in populations of Central, Eastern and Southeastern Europe [14], including Austria [15], Hungary [13], Slovenia [16], Greece [17], Poland [18], Slovakia [19], Russia [20], and the Czech Republic [21, 22]. Previous analyses of entire coding sequences of *BRCA1/2* genes performed in 500 and 1010 high-risk BC or OC patients from the two centers in the Czech Republic [22, 23] and unpublished results] and [21] consistently demonstrated that mutations in *BRCA1* account for more than 70% of identified gene alterations and that more than 90% of alterations in this gene represent most frequent recurrent mutations 5382insC and 300T>G and truncating mutations in exon 11 (25 different mutations). In *BRCA2*, the three repeatedly occurring mutations (5873C>A, 5910C>G and 5991insT) represented almost 40% (9/23) of deleterious defects [22].

We performed analysis of population-specific mutations in *BRCA1/2* genes in a cohort of unselected BC patients from the Prague area to estimate the frequency of mutation carriers among BC patients. Association of *BRCA1/2*-related carcinomas with specific clinical and histopathological characteristics was analyzed to evaluate the relevance of currently used criteria of mutation testing.

Patients and methods

Subjects. Genetic testing was performed in a series of consecutive female patients 27 to 86 years of age with a histologically confirmed diagnosis of primary invasive BC who were treated at the Department of Oncology of the General Teaching Hospital and the 1st Medical Faculty, Charles University in Prague or at the Department of Clinical Oncology, Central Military Hospital, Prague from September 2004 to December 2006. All patients had Czech ancestries and were living in Central Bohemia. Participants were included into the study without regard to age at diagnosis and BC or OC family history. Testing was performed immediately after confirmation of the pathologic diagnosis. Medical history and other clinical data on patients were obtained from medical records. Age at diagnosis, family history concerning the first- and second-degree relatives, tumor histology, receptor status and TNM stage were recorded. A total of 730 control blood samples were obtained regardless of age or sex from random blood donors originating from the same geographical region as the tested patients. The group comprised randomly chosen healthy individuals enrolled between April 2006 and November 2006 at the Department of Blood Transfusion of the Thomayer Faculty Hospital in Prague. The study was approved by the Ethical Committee of the First Faculty of Medicine and the General Teaching Hospital and all participants gave their written informed consent prior to genetic testing.

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

Analysis of population-specific alterations in *BRCA1/2* genes. The test panel was designed to harbor all previously identified recurrent mutations in *BRCA1/2* genes [22]. In addition, analysis also included truncating mutations in the whole exon 11 of *BRCA1*. 83% (83/100) of mutations previously found in high-risk families were identified within analyzed gene sequences. Mutations in exon 11 of *BRCA1* leading to the premature termination of protein translation were pre-screened by the protein truncation test (PTT) as described previously [24]. The most common pathogenic *BRCA1* mutation 5382insC was identified by a mismatch polymerase chain reaction (PCR) assay and restriction enzyme analysis as described in detail by Backe et al. [25]. The second most frequently occurring *BRCA1* mutation 300T>G was detected by the use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. PCR-fragments containing the site of mutation were obtained with primers (5'-CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG-3' - forward and 5'-TTGGAATAATTTACTGTGTGC-3' - reverse) flanking exon 5 of the gene. 10 µl reaction mixtures contained 1 µl of 10 x PCR buffer (Roche, Mannheim, Germany), 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer, 0.5 U of Fast Start Taq DNA polymerase (Roche) and 50-100 ng of genomic DNA. After an initial denaturation (at 95°C for 3 min), 35 cycles (at 95°C for 30 sec, 58°C for 30 sec and 72°C for 2 min) and final extension (at 72°C for 7 min) were performed. Wild type PCR products carrying a single site for the restriction endonuclease *Cfr13I* (Fermentas, St. Leon Rot, Germany) are digested into a 144-bp and a 186-bp fragment. The 300T>G mutation introduces the second restriction site. Therefore, the aberrant allele is digested by the *Cfr13I* into a 144-bp, a 174-bp and a 12-bp fragment. PCR products digested by *Cfr13I* under conditions described by the supplier were run on precast Spreadex EL300 gels [26] using SEA 2000 electrophoretic apparatus (Elchrom Scientific AG, Cham, Switzerland). Separated fragments were visualized by SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Screening for *BRCA2* mutations included analysis of a 230 bp fragment of exon 11 by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). Amplifications were performed in 15 µl reaction mixtures containing 1.5 µl of 10 x PCR buffer, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer (5'-CGTTTGTGTTTCACATGAAAC-3' - forward and 5'-CTTCACTCTGAATGTCAGCA -3' - reverse), 0.6 U Gold Taq DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 100 ng of genomic DNA. After an initial denaturation (at 95°C for 10 min), 10 cycles (at 95°C for 30 sec, 65°C -1°C/cycle for 30 sec and 72°C for 2 min) followed by 25 cycles (at 95°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 2 min) and final extension (at 72°C for 7 min) were performed. 5 µl aliquots of the PCR reactions were resolved using DHPLC (WAVE 3500 System;

Transgenomic, Omaha, NE) on the DNASep cartridge at 55°C in a gradient of 58–67% acetonitrile-containing Buffer B.

DNA sequencing. Alterations detected by PTT, RFLP or DHPLC-analyses were confirmed and characterized by direct sequencing from independently amplified PCR fragments using the BigDye terminator cycle sequencing kit version 3.1 in a ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems).

Statistical analysis. The mean, median, SD, variance, quartiles and other basic statistical measurements were computed in given groups and subgroups. Proportions, frequencies, odds ratios and 95% confidence intervals were computed using CRAN 2.4.0. statistical analysis software release 8.02. Statistical significance was assessed using logistic regression analysis and non-parametric Wilcoxon test.

Results

Analysis of pathogenic mutations in BRCA1/2 genes. A total of 679 incident BC patients were examined for mutations in BRCA1/2 genes. Sixteen deleterious germ-line mutations were identified (Table 1), accounting for 2.4% (95% CI 1.2–3.5) of invasive BC cases associated with alterations in BRCA1/2 genes. BRCA1 mutations were found in 14 (2.1%; 95% CI 0.9–3.1) patients whereas BRCA2 mutations in 2 (0.3%; 95% CI 0.0–0.7) patients. The most frequent mutation was the BRCA1 5382insC detected in 7 (1.0%) participants. The BRCA1 300T>G was identified in 3 (0.4%) patients and other previously identified locally prevalent mutations – BRCA1 1806C>T and 3819del5 and BRCA2 5991insT and 5873C>T – were found each in one patient (0.15%). Two BRCA1 mutations –2607dup10 and 1135insA – were not previously detected in our series of high-risk families [22]. Among 730 control blood samples analyzed for BRCA1 5382insC one positively tested individual was present. Population frequency of 0.14% (95% CI 0.0–0.4) was estimated for this mutation. None of the control samples carried recurrent mutations 3819del5 and 3875delGTCT identified in exon 11 of BRCA1.

Clinical and histopathological characteristics of BC patients carrying alteration in BRCA1/2 genes. Table 2 summarizes clinical and histopathological data of analyzed BC patients in relation to their carrier status. The mean age at diagnosis of BC was lower in BRCA1/2 mutation carriers (50.8 years) than in non-carriers (56.0 years) nevertheless the difference did not reach statistical significance ($p = 0.06$). However, BC patients diagnosed at the age ≤ 50 had a more than two-fold increased chance of being a mutation carrier than patients diagnosed after 50. Of 16 identified mutation carriers, two patients (12.5%) with a family history of OC and one (6.25%) with a history of BC were registered. In non-carriers, family history was available in 590 cases and BC and OC were reported in 80 (13.6%) and 10 (1.7%) families, respectively. In our series of BC patients, family history of OC strongly predicted the presence of a BRCA1/2 mutation (OR = 8.3; 95% CI 1.7–41.4; $p = 0.01$). On the contrary, family history of BC did not increase the chance of being a mutation carrier. No family history

of BC or OC was registered in 13 out of 16 (81.3%) mutation carriers. The incidence of bilateral BC was significantly higher in BRCA1/2 mutation carriers (2/16; 12.5%) than that in non-carriers (11/663; 1.7%; OR = 7.5; 95% CI 1.5–37.3; $p = 0.01$). The histological data were available for all mutation carriers and 558 non-carriers. Invasive ductal carcinomas predominated both in women with BRCA1/2-related BC and in mutation negative patients. A significant association was found between a mutation status and medullary carcinoma. A total of 4 (25.0%) medullary carcinomas were identified among 16 BRCA1/2-related breast tumors whereas 15 (2.7%) tumors of this histological subtype were found in a group of 558 mutation negative women (OR = 12.1; 95% CI 3.5–41.8; $p = 0.0001$). We did not reveal any significant difference in tumor grade or stage comparing BRCA1/2 positive and negative individuals (data not shown). The BRCA1/2-associated tumors were more often progesterone receptor negative than tumors in non-carriers [68.8% vs. 34.6% (OR = 4.2; 95% CI 1.4–12.2; $p = 0.01$)]. Further, we registered increased frequency of triple-negativity (a lack of expression of estrogen, progesterone, and ErbB-2 receptors) in BRCA1/2-related tumors [12.5% vs. 3.6% (OR = 3.8; 95% CI 0.8–18.3; $p = 0.09$)]. On the contrary, no association between mutation status and estrogen receptor expression was found.

Discussion

BRCA1/2 mutations were intensively studied in families at high-risk of BC. However, in unselected BC cases, the role of these mutations in BC development remains unclear in many populations. We have searched for population-specific mutations of BRCA1/2 genes in a cohort of BC patients selected regardless of age at diagnosis or family history and found 2.4% of mutation carriers. Assuming 83% mutation detection sensitivity (this percentage of gene alterations was previously found within analyzed gene sequences in high-risk patients from the Prague area), the approximate frequency of pathogenic BRCA1/2 mutations in BC patients may be estimated at 2.8%. Nevertheless, this calculation may be underestimated since analysis was focused only on identified point mutations and short deletions or insertions and screening for large intragenic deletions and rearrangements, which may represent more than 10% of all deleterious mutations in the Czech Republic [27, 28], was omitted. The spectrum of cancer-predisposing mutations detected in this study was similar to that obtained previously in high-risk patients and all identified gene alterations were already described in the Czech Republic [21, 22]. The most common BRCA1 alterations, 5382insC and 300T>G, were identified in 50% (7/14) and 21.4% (3/14) of BRCA1 mutation carriers whereas frequencies of these mutations previously identified in high-risk families were 51.4% (18/35) and 8.6% (3/35), respectively [22]. Further, we revealed other locally prevalent mutations; 1806C>T and 3819del5 in BRCA1 and 5991insT and 5873C>T in BRCA2 [22]. BRCA1 mutations – 1135insA and 2607dup10 – were previously disclosed at the

Table 1 Clinical Characteristics of BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers

Patient No.	Exon	Mutation	Effect	Histology of breast cancer	Age at dg. years	Family history of cancer 1 (age at diagnosis)
BRCA 1						
196	20	5382insC	Gln1756fsX1829	Lobular	58	-
197	20	5382insC	Gln1756fsX1829	Ductal	44	Ovarian, M (50), ovarian, MGM (50)
302	20	5382insC	Gln1756fsX1829	Medullary	55	-
304	20	5382insC	Gln1756fsX1829	Medullary	39	-
592	20	5382insC	Gln1756fsX1829	Ductal	46	Endometrial, M (?) ovarian, S (?)
639	20	5382insC	Gln1756fsX1829	Ductal	61	Lung, F (?)
689	20	5382insC	Gln1756fsX1829	Ductal in situ	50	-
278	5	300T>G	Cys61Gly	Ductal	61	Breast, M (57)
364	5	300T>G	Cys61Gly	Mucoid	47	-
365	5	300T>G	Cys61Gly	Medullary	28	-
214	11	1135insA	Lys339fsX345	Medullary/Ductal	43/51	Brain, F (?), prostatic, MGF (?)
708	11	1806C>T	Gln563X	Ductal	53	-
660	11	2607_2616dup10	Lys833fsX	Ductal	50	-
331	11	3819del 5	Val1234fsX1241	Ductal/Ductal	51/53	-
BRCA2						
691	11	5873C>A	p.Ser1882X	Ductal	67	Endometrial, M (?)
542	11	5991insT	p.Ala1922fsX1923	Lobular	61	Stomach, M (62), lung, S (67)

¹ Abbreviations: M, mother; MGM, maternal grandmother; S, sister; F, father; MGF, maternal grandfather.

Table 2 Clinical and Histopathological Characteristics of Breast Cancer Cases

	BRCA 1/2 Carriers (%)	Non-carriers (%)	OR ¹	CI 95%	p value
<i>Age at Diagnosis (n=651)²</i>					
≤ 50 years	8 (50.0)	199 (31.3)	2.2	0.8 - 5.9	0.1
> 50 years	8 (50.0)	436 (68.7)	0.5	0.2 - 1.2	0.1
<i>Family History of (n= 606)</i>					
Breast cancer	1 (6.3)	80 (13.6)	0.4	0.1 - 3.3	0.4
Ovarian cancer	2 (12.5)	10 (1.7)	8.3	1.7 - 41.4	0.01
Bilateral BC (n=679)	2 (12.5)	11 (1.7)	7.5	1.5 - 37.3	0.01
<i>Histological Type (n= 574)</i>					
Invasive ductal	8 (50.0)	403 (72.2)	0.4	0.1 - 1.0	0.06
Invasive lobular	2 (12.5)	79 (14.2)	0.9	0.2 - 3.9	0.8
Medullary	4 (25.0)	15 (2.7)	12.1	3.5 - 41.8	0.0001
Other types	2 (12.5)	61 (10.9)	1.2	0.3 - 5.2	0.8
<i>ER Status (n= 487)</i>					
ER positive	12 (75.0)	371 (78.8)	0.8	0.3 - 2.6	0.7
ER negative	4 (25.0)	100 (21.2)	1.2	0.4 - 3.9	0.7
<i>PR Status (n= 400)</i>					
PR positive	5 (31.25)	251 (65.4)	0.2	0.1 - 0.7	0.01
PR negative	11 (68.75)	133 (34.6)	4.2	1.4 - 12.2	0.01
<i>Triple Negative Tumors (n=462)</i>	2 (12.5)	16 (3.6)	3.8	0.8 - 18.3	0.09

¹Value corresponds to the difference between mutation carriers and non-carriers.

²Number of patients with data available.

Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic [21]. Different spectra but similar frequencies of *BRCA1/2* mutations were reported in other population-based series of

BC cases tested for locally common mutations. Prevalence of mutations in these genes was 1.8% (19/1035) in the Finnish study [29], 2.5% in the Norwegian study [30], and 3.6%

(18/500) in the Hungarian study [13]. Testing for the three most frequently occurring founder mutations of *BRCA1* in 3472 unselected incident cases of early-onset BC in Poland identified 198 gene alterations (5.7%) [31]. Screening of the entire coding sequence of both genes was performed in the UK in a series of 1220 BC patients diagnosed before the age of 55 and in a group of 1628 American BC cases of age range 35-64 years. In the UK, *BRCA1* mutation carriers were identified in 0.7% (8/1220) of cases whereas *BRCA2* carriers were found in 1.3% (16/1220) of cases [32]. Among American women, 2.4% and 2.3% carried deleterious mutations in *BRCA1* and *BRCA2*, respectively [33].

As expected, carriers of *BRCA1/2* mutations were diagnosed earlier compared to BC patients without a mutation. Frequency of 3.9% (8/207) was found for cases diagnosed under or at the age of 50 whereas among individuals diagnosed after 50 the mutation frequency was 1.8% (8/444). Two deleterious *BRCA1* mutations were found in a group of 12 patients (16.7%) with invasive BC who reported a family history of OC. Thus, in analyzed BC patients a family history of OC seems to be a strong indicator of mutation in *BRCA1*. This result is in agreement with the findings of the Finnish [29] and Spanish [34] studies. On the other hand, only one pathogenic *BRCA1* alteration was detected in 80 patients (1.3%) from families with a history of BC. Medullary carcinoma is referred to account for about 2-3% of BC cases [35]. In our series, the incidence of medullary carcinoma was 3.3% (19/574). Remarkably, a total of 4 (21.1%) mutation carriers in *BRCA1* were found among women with this histological tumor subtype. Family history of BC or OC was not reported by these *BRCA1*-related BC patients. One of these women was diagnosed at the age of 28; the other exhibited the triple-negative phenotype, which is reported to be common among *BRCA1* germ-line mutation carriers [36]. The other two women did not fulfill currently used criteria for genetic testing [22] (Table 1). Therefore, it seems that indication of patients with medullary carcinoma for *BRCA1* testing, regardless of the family history and age at diagnosis, may be helpful in mutation screening. Our results are in agreement with the study of Eisinger et al. [37] who found mutations in *BRCA1* in 11% of patients with medullary carcinoma. Another French study found medullary histology in 14.3% *BRCA1/2* mutation carriers [38].

Among 16 *BRCA1/2* mutation carriers identified in our study, family history based criteria would have distinguished only two patients. Indication of patients with an early age of onset and with medullary carcinoma for genetic testing would identify additional four carriers. Unexpectedly, 10 out of 16 patients (62.5%) did not meet any of currently used criteria for mutation screening [22] (Table 1).

In conclusion, no clinical characteristics that would indicate alterations in predisposition genes were found in the majority of carriers identified in our population-based study. Accordingly, testing for *BRCA1/2* mutations in the Czech population may not be restricted only to patients with a family history of BC and/or OC or to other high-risk patients who meet cur-

rently applied criteria for genetic testing. Our results indicate that rapid and inexpensive testing of all BC patients for the most frequent recurrent mutations - prior to analysis of entire coding sequences in high-risk patients - might extend substantially the percentage of identified mutation carriers.

Acknowledgements. We thank Marie Epsteinova for her technical assistance. For DNA samples of BC patients, we thank Petr Cinek, MD, PhD, Department of Clinical Oncology, Central Military Hospital, Prague. For blood samples of control population, we thank Drahomira Springer, PhD, Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics of the 1st Medical Faculty, Charles University in Prague. This project was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, Grant No. NR 9051-3 and NS 10304-3; and the Ministry of Education, Grant No. MSM 0021620808.

References

- [1] EASTON D, PETO J The contribution of inherited predisposition to cancer incidence. *Cancer Surv* 1990; 9: 395-416.
- [2] CLAUS EB, RISCH N, THOMPSON WD Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer* 1994; 73: 643-651. doi:10.1002/1097-0142(19940201)73:3<643::AID-CNCR2820730323>3.0.CO;2-5
- [3] The Breast Cancer Linkage Consortium. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations and sporadic cases. *Lancet* 1997; 349: 1505-1510. doi:10.1016/S0140-6736(96)10109-4
- [4] MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D, FUTREAL PA, HARSHMAN K et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* 1994; 266: 66-71. doi:10.1126/science.7545954
- [5] WOOSTER R, BIGNELL G, LANCASTER J, SWIFT S, SEAL S et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* 1995; 378: 762-763. doi:10.1038/378789a0
- [6] FORD D, EASTON DF, STRATTON M, NAROD S, GOLDGAR D et al. The Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 676-689. doi:10.1086/301749
- [7] BROSE MS, REBBECK TR, CALZONE KA, STOPFER JE, NATHANSON KL et al. Cancer risk estimates for *BRCA1* mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1365-1372.
- [8] KING MC, MARKS JH, MANDELL JB, New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Science* 2003; 302: 643-646. doi:10.1126/science.1088759
- [9] SMITH KL, ISAACS C Management of women at increased risk for hereditary breast cancer. *Breast Dis* 2006-2007; 27: 51-67.
- [10] MUSOLINO A, BELLA MA, BORTESI B, MICHIARA M, NALDI N et al. *BRCA* mutations, molecular markers, and clinical variables in early-onset breast cancer: a population-based study. *Breast* 2007; 16: 280-292. doi:10.1016/j.breast.2006.12.003

- [11] GRONWALD J, HUZARSKI T, BYRSKI T, DEBNIAK T, METCALFE K et al. Direct-to-patient BRCA1 testing: the Twoj Styl experience. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100: 239-245. [doi:10.1007/s10549-006-9261-5](https://doi.org/10.1007/s10549-006-9261-5)
- [12] JOHANNESDOTTIR G, GUDMUNDSSON J, BERGTHORSSON JT, ARASON A, AGNARSSON BA et al. High prevalence of the 999del5 mutation in Icelandic breast and ovarian cancer patients. *Cancer Res* 1996; 56: 3663-3665.
- [13] VAN DER LOOIJ M, SZABO C, BESZNYAK I, LISZKA G, CSOKAY B et al. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary. *Int J Cancer* 2000; 86: 737-740. [doi:10.1002/\(SICI\)1097-0215\(20000601\)86:5<737::AID-IJC21>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(20000601)86:5<737::AID-IJC21>3.0.CO;2-1)
- [14] Breast Cancer Information Core (BIC) [<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>]
- [15] WAGNER TM, MOSLINGER RA, MUHR D, LANGBAUER G, HIRTENLEHNER K et al. BRCA1-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific BRCA1 mutations and pathological characteristics. *Int J Cancer* 1998; 77: 354-360. [doi:10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980729\)77:3<354::AID-IJC8>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980729)77:3<354::AID-IJC8>3.0.CO;2-N)
- [16] KRAJC M, TEUGELS E, ZGAJNAR J, GOELEN G, BESIC N et al. Five recurrent BRCA1/2 mutations are responsible for cancer predisposition in the majority of Slovenian breast cancer families. *BMC Med Genet* 2008; 9: 83. [doi:10.1186/1471-2350-9-83](https://doi.org/10.1186/1471-2350-9-83)
- [17] KONSTANTOPOULOU I, RAMPIAS T, LADOPOULOU A, KOUTSODONTIS G, ARMAOU S et al. Greek BRCA1 and BRCA2 mutation spectrum: two BRCA1 mutations account for half the carriers found among high-risk breast/ovarian cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107: 431-441. [doi:10.1007/s10549-007-9571-2](https://doi.org/10.1007/s10549-007-9571-2)
- [18] GORSKI B, BYRSKI T, HUZARSKI T, JAKUBOWSKA A, MENKISZAK J et al. Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1963-1968. [doi:10.1086/302922](https://doi.org/10.1086/302922)
- [19] CIERNIKOVA S, TOMKA M, KOVAC M, STEVURKOVA V, ZAJAC V Ashkenazi founder BRCA1/BRCA2 mutations in Slovak hereditary breast and/or ovarian cancer families. *Neoplasma* 2006; 53: 97-102.
- [20] GAYTHER SA, HARRINGTON P, RUSSELL P, KHARKEVICH G, GARKAVTSEVA RF et al. Frequently occurring germ-line mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer families from Russia. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1239-1242.
- [21] MACHACKOVA E, FORETOVA L, LUKESOVA M, VASICKOVA P, NAVRATILOVA M et al. Spectrum and characterisation of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 140. [doi:10.1186/1471-2407-8-140](https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-140)
- [22] POHLREICH P, ZIKAN M, STRIBRNA J, KLEIBL Z, JANATOVA M et al. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R728-736. [doi:10.1186/bcr1282](https://doi.org/10.1186/bcr1282)
- [23] ZIKAN M, POHLREICH P, STRIBRNA J Mutational analysis of the BRCA1 gene in 30 Czech ovarian cancer patients. *J Genet* 2005; 84: 63-67. [doi:10.1007/BF02715891](https://doi.org/10.1007/BF02715891)
- [24] POHLREICH P, STRIBRNA J, KLEIBL Z, ZIKÁN M, KALBÁCOVÁ R et al. Mutations of the BRCA1 gene in hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic. *Med Princ Pract* 2003; 12: 23-29. [doi:10.1159/000068163](https://doi.org/10.1159/000068163)
- [25] BACKE J, HOFFERBERT S, SKAWRAN B, DÖRK T, STUHRMANN M et al. Frequency of BRCA1 mutation 5382insC in German breast cancer patients. *Gynecol Oncol* 1999; 72: 402-406. [doi:10.1006/gyno.1998.5270](https://doi.org/10.1006/gyno.1998.5270)
- [26] JANATOVA M, POHLREICH P, MATOUS B Detection of the most frequent mutations in BRCA1 gene on polyacrylamide gels containing Spreadex Polymer NAB. *Neoplasma* 2003; 50: 246-250.
- [27] VASICKOVA P, MACHACKOVA E, LUKESOVA M, DAMBORSKY J, HORKY O et al. High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangements in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic. *BMC Med Genet* 2007; 8: 32. [doi:10.1186/1471-2350-8-32](https://doi.org/10.1186/1471-2350-8-32)
- [28] ZIKAN M, POHLREICH P, STRIBRNA J Novel complex genomic rearrangement of the BRCA1 gene. *Mutat Res* 2008; 637: 205-208. [doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.08.002](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.08.002)
- [29] SYRJAKOSKI K, VAHTERISTO P, EEROLA H, TAMMINEN A, KIVINUMMI K et al. A population-based study of BRCA1 and BRCA2 mutations in 1035 unselected Finnish breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1529-1531. [doi:10.1093/jnci/92.18.1529](https://doi.org/10.1093/jnci/92.18.1529)
- [30] MØLLER P, HAGEN AI, APOLD J, MAEHLE L, CLARK N et al. Genetic epidemiology of BRCA mutations - family history detects less than 50% of the mutation carriers. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1713-1717. [doi:10.1016/j.ejca.2007.04.023](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.04.023)
- [31] LUBINSKI J, GORSKI B, HUZARSKI T, BYRSKI T, GRONWALD J et al. BRCA1-positive breast cancers in young women from Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 99: 71-76. [doi:10.1007/s10549-006-9182-3](https://doi.org/10.1007/s10549-006-9182-3)
- [32] Anglian Breast Cancer Study Group: Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer* 2000; 83: 1301-1308. [doi:10.1054/bjoc.2000.1407](https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1407)
- [33] MALONE KE, DALING JR, DOODY DR, HSU L, BERNSTEIN L et al. 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* 2006; 66: 8297-8308. [doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0503](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0503)
- [34] DE SANJOSE S, LEONE M, BEREZ V, IZQUIERDO A, FONT R et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in young breast cancer patients: a population-based study. *Int J Cancer* 2003; 106: 588-593. [doi:10.1002/ijc.11271](https://doi.org/10.1002/ijc.11271)
- [35] SHOUSHA S Medullary carcinoma of the breast and BRCA1 mutation. *Histopathology* 2000; 37: 182-185. [doi:10.1046/j.1365-2559.2000.00880.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2000.00880.x)
- [36] BRENTON JD, CAREY LA, AHMED AA, CALDAS C Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005; 23: 7350-7360. [doi:10.1200/JCO.2005.03.3845](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.3845)
- [37] EISINGER F, JACQUEMIER J, CHARPIN C, STOPPA-LYONNET D, Bressac-De Paillerets B et al. Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited. *Cancer Res* 1998; 58: 1588-1592.

- [38] BONADONA V, DUSSART-MOSER S, VOIRIN N, SINIL-
NIKOVA OM, MIGNOTTE H et al. Prognosis of early-onset
breast cancer based on BRCA1/2 mutation status in a French
population-based cohort and review. *Breast Cancer Res Treat*
2007; 101: 233–245. [doi:10.1007/s10549-006-9288-7](https://doi.org/10.1007/s10549-006-9288-7)

Germline mutations 657del5 and 643C>T (R215W) in *NBN* are not likely to be associated with increased risk of breast cancer in Czech women

Martin Mateju · Petra Kleiblova · Zdenek Kleibl ·
Marketa Janatova · Jana Soukupova ·
Ivana Ticha · Jan Novotny · Petr Pohlreich

Received: 20 March 2012 / Accepted: 21 March 2012 / Published online: 11 April 2012
© Springer Science+Business Media, LLC. 2012

To the Editor,

The *NBN* (formerly *NBS1*) gene (OMIM*602667) is located on chromosome 8q21 and encodes a 754-amino acid protein known as nibrin. Nibrin is a component of the MRE11/RAD50/NBN (MRN) complex and is involved in the DNA double-strand break repair, telomere maintenance, and cell-cycle checkpoint control. Individuals homozygous for deleterious mutations in *NBN* develop an autosomal recessive disorder, Nijmegen breakage syndrome (NBS; #251260), characterized by microcephaly, growth retardation, immunodeficiency, hypersensitivity to X-irradiation, and increased risk of lymphoid malignancies [1]. About 90 % of NBS patients carry the homozygous mutation 657del5 (c.657_661delACAAA) affecting exon 6 of the *NBN* gene that has been predominantly identified in Slavic populations [2, 3]. Another potentially deleterious *NBN* alteration, the missense substitution c.643C>T (p.R215W), is also located in exon 6 and has been described in two severely affected NBS siblings who were compound heterozygotes for the 657del5 and R215W

mutations [4]. Previous studies suggested that heterozygous carriers of the founder mutation 657del5 or R215W have an increased risk of breast cancer (BC) in several European populations [5–7]. However, the role of these mutations was not tested in other countries and the 657del5 mutation did not contribute significantly to BC risk in the German population [7, 8]. No deleterious *NBN* mutations were identified in China [9].

Based on the results of our analysis, we would like to contribute to the debate on the role of the 657del5 and R215W mutations in BC susceptibility. The frequency of both *NBN* mutations was analyzed in 1,303 Czech patients (including 600 high-risk, hereditary and non-hereditary, *BRCA1/2*-negative breast/ovarian cancer patients [10], and 703 consecutive unselected BC patients) and in 915 control non-cancer individuals (Table 1) [11]. The DNA was isolated from blood samples by routine procedures. Screening for mutations affecting exon 6 and adjacent intronic regions of the *NBN* gene was performed by a high resolution melting (HRM) analysis using the LightCycler 480 HRM Master Kit and the LightCycler 480 (Roche) according to the manufacturer's instructions. Sequences of the primers are available on request. Mutations in samples with an aberrant melting profile were confirmed by direct sequencing using the BigDye Terminator v3.1 in ABI PRISM 3130 genetic analyzer (Life Technologies).

In addition to the truncating 657del5 mutation found in two high-risk patients, two unselected BC cases, but also in two controls, we also detected the R215W and other three different missense variants in exon 6 of the *NBN* gene (Table 1). In intronic regions, we observed one substitution (c.585–4A>G) only in a high-risk BC patient, while three other variants (c.585–5T>C and c.702+9G>A observed once and c.702+26C>G observed twice) were detected only in control samples.

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

P. Kleiblova · Z. Kleibl · M. Janatova · J. Soukupova ·
I. Ticha · 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

Present Address:

I. Ticha
Division of Clinical Sciences, Department of Clinical and
Experimental Medicine, Faculty of Health Sciences,
Linköping University, Linköping, Sweden

Table 1 The spectrum of germline mutations in exon 6 of the *NBN* gene detected in Czech high-risk breast/ovarian cancer patients, unselected BC cases, and non-cancer controls. For high-risk patients,the subgroups of analyzed patients with female BC ($N = 487$), OC ($N = 96$), and male BC ($N = 17$) are specified

Analyzed populations	NBN exon 6 variants Nucleotide change (protein change) N (%)				
	c.657_661del5 (p.K219Nfs*16)	c.643C>T (p.R215W)	c.628G>T (p.V210F) ^a	c.595C>T (p.P199S) ^b	c.596C>G (p.P199R) ^b
High-risk BC/OC (<i>BRCA1/2</i>^{-ve}) ($N = 600$)	2 (0.33)	1 (0.17)	1 (0.17)	1 (0.17)	0
<i>Probands with BC</i>					
Hereditary BC ($N = 255$)	0	0	1 (0.44)	0	0
2× BC < 50 year					
1× BC < 50 year + OC					
≥3× BC					
≥3× BC/OC					
Non-hereditary BC ($N = 232$)	1 (0.43)	0	0	1 (0.43)	0
BC < 36 year					
Bilateral BC < 51 year					
BC + OC duplicity					
Medullary BC					
Triple-negative BC					
<i>Probands with OC</i>					
Hereditary OC ($N = 29$)	0	0	0	0	0
≥OC + BC < 50 year					
≥3× OC/BC					
≥2× OC					
Non-hereditary OC ($N = 67$)	1 (1.50)	1 (1.50)	0	0	0
OC < 50 year					
Male BC ($N = 17$)	0	0	0	0	0
Unselected BC cases ($N = 703$)	2 (0.28)	3 (0.43)	2 (0.28)	0	1 (0.14)
Non-cancer controls ($N = 915$)	2 (0.22)	4 (0.44)	2 (0.22)	0	1 (0.11)

^a Described by Varon et al. [2]^b Novel variants

In analyzed female BC patients, the 657del5 mutation was found in a woman with a medullary BC from the high-risk group of 487 BC patients (0.21 %; $p = 1.0$) and in 2/703 unselected BC cases (0.28 %; $p = 0.8$). Thus, the frequencies of the 657del5 mutation did not differ significantly between both BC patient groups and controls. Similar non-significant results were also obtained for the R215W mutation and other identified missense variants (Table 1). In probands with ovarian cancer (OC), two mutations in *NBN* (657del5 or R215W) were found in a subgroup of 67 young women with non-hereditary OC (Table 1). However, owing to the low number of individuals screened and alterations found, it was not possible to estimate the contribution of the detected mutations to the development of OC in this group of affected women. No *NBN* mutations were found in a group of 17 male BC patients.

The results of our study are not in agreement with some previously published data evaluating the effect of the *NBN*

mutations 657del5 and R215W on BC development. In a study by Gorski et al. [5] from the Szczecin area in Poland, the 657del5 mutation was detected in 3/80 familial BC patients (3.7 %), in 2/150 consecutive BC cases diagnosed under the age of 50 (1.3 %), and in 3/530 controls (0.6 %). Steffen et al. [6] found 11 carriers of the 657del5 mutation in 562 (1.96 %) unselected BC patients in central Poland, while ten carriers were detected in 1,620 (0.62 %) controls. No carriers of the R215W mutation were found in this series of patients. An analysis by Bogdanova et al. [7] performed in a large series of BC cases and controls from Belarus and northern Germany, identified 15 carriers of the 657del5 (0.9 %) and nine carriers of the R215W (0.6 %) mutation among 1,588 Belarusian unselected BC patients, while 1,014 population controls yielded only one (0.1 %) and five (0.49 %) carriers of these mutations, respectively. In the series of BC cases and controls from northern Germany, one carrier (0.1 %) of the 657del5 mutation and nine

carriers (0.8 %) of the R215W mutation were detected in 1,076 cases, while 1,017 controls yielded no carrier of the 657del5 and 2 carriers (0.2 %) of the R215W mutation. On the other hand, our results are in agreement with the results published by Carlomagno et al. [8] who found one 657del5 mutation in 477 BC patients (0.21 %) and 866 controls (0.12 %), respectively.

In our groups of Czech BC patients, the 657del5 mutation was 5–10 times less frequent than in patients from Poland or Belarus, and the frequency of mutations did not markedly differ from that found in the control group. The lower frequency of the R215W mutation in the high-risk cases compared to the unselected BC patients and controls also does not suggest its association with BC development. In conclusion, the frequency of the *NBN* 657del5 and R215W mutations in the Czech population is low, and no association of these mutations with BC susceptibility was demonstrated.

Acknowledgments We would like to thank Stanislav Kormunda for the statistical analyses and Marie Epsteinova for her excellent technical assistance. The project was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, Grant No. NS 10304-3/2009.

Conflict of interest None.

References

1. Varon R, Vissinga C, Platzter M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanová E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93:467–476
2. Varon R, Seemanova E, Chrzanowska K, Hnateyko O, Piekutowska-Abramczuk D, Krajewska-Walasek M, Sykut-Cegielska J, Sperling K, Reis A (2000) Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur J Hum Genet* 8:900–902
3. Maurer MH, Hoffmann K, Sperling K, Varon R (2010) High prevalence of the *NBN* gene mutation c.657–661del5 in Southeast Germany. *J Appl Genet* 51:211–214
4. di Masi A, Antoccia A (2008) NBS1 heterozygosity and cancer risk. *Curr Genomics* 9:275–281
5. Gorski B, Debniak T, Masojc B, Mierzejewski M, Medrek K, Cybulski C, Jakubowska A, Kurzawski G, Chosia M, Scott R, Lubinski J (2003) Germline 657del5 mutation in the *NBS1* gene in breast cancer patients. *Int J Cancer* 106:379–381
6. Steffen J, Nowakowska D, Niwinska A, Czupczak D, Kluska A, Piatkowska M, Wisniewska A, Paszko Z (2006) Germline mutations 657del5 of the *NBS1* gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland. *Int J Cancer* 119:47–472
7. Bogdanova N, Feshchenko S, Schurmann P, Waltes R, Wieland B, Hillemanns P, Rogov YI, Dammann O, Bremer M, Karstens JH, Sohn C, Varon R, Dörk T (2008) Nijmegen breakage syndrome mutations and risk of breast cancer. *Int J Cancer* 122:802–806
8. Carlomagno F, Chang-Claude J, Dunning AM, Ponder BA (1999) Determination of the frequency of the common 657del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 25:393–395
9. He M, Di GH, Cao AY, Hu Z, Jin W, Shen ZZ, Shao ZM (2011) *RAD50* and *NBS1* are not likely to be susceptibility genes in Chinese non-*BRCA1/2* hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. doi:10.1007/s10549-011-1700-2
10. Pohlreich P, Zikan M, Stribrna J, Kleibl Z, Janatova M, Kotlas J, Zidovska J, Novotny J, Petruzalka 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
11. 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

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 / Published online: 5 February 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

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 (ψ *BRCA1*) 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 v4.0 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 (36.934 kb)	¹ F: ACCTAAAATTCCTTCTGCTGGAC R: CAAAGAACGACTAACCTGGCA	197249–235352 ^a	1.2	MLPA, LR-PCR
1–17 (80.496 kb)	F: TATCCCAGTGACTTTCCAGC R: TGAGAGGGATGGGAGAATAC	208205–290011 ^a	1.3	MLPA, aCGH, LR-PCR
5–10 (15.552 kb)	F: AGGCAGTCATGCATTAGTTTG R: CCGTCTCAGAAAATTCACAAG	17563–33895 ^b	0.8	MLPA, LR-PCR
5–14 (31.583 kb)	² F: CTTACCTACCTACATTCAC R: CTTTATGTAGGATTCAGAGTA	19244–54463 ^b	3.6	MLPA, LR-PCR
13–19 (25.201 kb)	F: ACCAGTTTATGCTCTTCCAG R: GCCTATAAGATGCATTCCCT	41617–67533 ^b	0.7	MLPA, LR-PCR
18–22 (16.316 kb)	F: GCTCGTGTACAAGTTTGCCAGA R: ATGGAAGCCATTGCTCTGTGTC	61040–81093 ^b	3.7	MLPA, aCGH, LR-PCR
21–22 (3.779 kb)	F: AGCATGATTTTGAAGTCAGAGGAG R: GTCCAGGCATCTGGCTGCACAACCACAA	71596–81074 ^b	5.9	cDNA analysis, LR-PCR
21–24 (25.639 kb)	F: TTATCTCATAACTAGGCATCC R: TTCCTGAAAGTCCTCAGAGC	75369–101263 ^b	0.3	MLPA, aCGH, LR-PCR

^{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 v3.1 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_234508del136934 ^b c.1-32787_80+4067del136934 ^d	No transcript?	Ψ <i>BRCA1</i> / <i>BRCA1</i>	779	BC (<u>58</u> *); OC (<u>51</u> *, 47)	–	[7, 14, 34]
1–17	chr17:38,470,578–38,551,073 ^a g.208928_289423del180496 ^b c.1-21434_5075-1084del180496 ^d	Loss of ~90% of coding sequence	<i>AluY/AluY</i>	206 225 269 416	BC (<u>28</u> , 50, 50) BC (27); OC (<u>40</u>) BC (<u>35</u> , 36) BC (39, 62*); OC (<u>42</u> , 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	<i>AluSx/AluY</i> / <i>AluJb</i>	1190	BC (50, 50); OC (<u>46</u>)	–	Novel
5–14	chr17:38,480,980–38,512,561 ^a g.21716_53298del131583 ^c c.135-485_4485-913del131583 ^d	p.Lys45_Lys1495del	LINE/–	278 453 862 938	BC (<u>40/41</u> , 63, 69, 35/35) BC (<u>39</u>) BC (<u>44</u> , 48*); OC (60, 64*) BC (<u>32</u> , ?*, ?); OC (?*)	Pancreas, uterus – Prostate –	[7, 22]
13–19	chr17:38,467,226–38,492,424 ^a g.41850_67050del125201 ^c c.4185+4062_5193+1650del 25201 ^d	p.Gln1396_Glu1731del	–/ <i>AluSx</i>	571	BC (<u>56/56</u> , 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	<i>AluY/AluSx</i>	897	BC (<u>35</u> , 64, ?, ?, ?, ?)	–	Novel
21–22	chr17:38,453,374–38,457,152 ^a g.77128-80906del13779ins236 ^c c.5278-492_5407-128del 3779ins236 ^d	p.Ile1760_Thr1802del	<i>AluSx/AluJb</i>	102	OC (<u>36</u>)	–	[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 (<u>38</u> , ?, ?)	–	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_80906del13779ins236) 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 <i>BRCA1</i> (%)	Small mutations in <i>BRCA2</i> (%)	LGRs in families in the study (%)	LGRs in families negatively tested for <i>BRCA1/2</i> 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

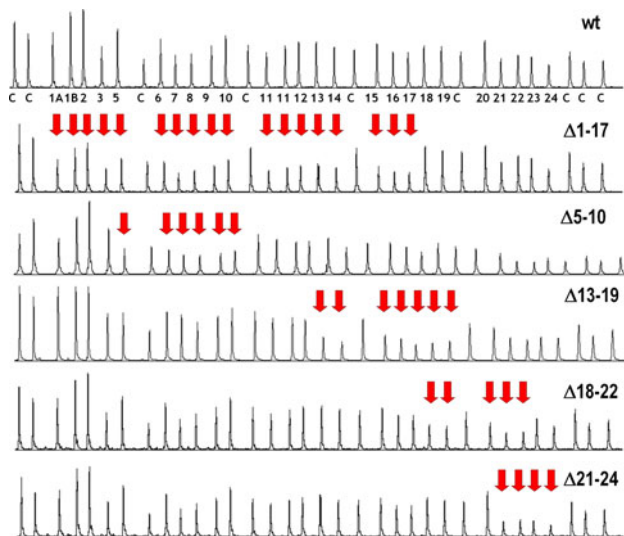


Fig. 1 Five novel deletions in *BRCA1* gene identified by MLPA analysis. Control sample is indicated by wt, numbers denote exons of *BRCA1*, C—control DNA sequences. Arrows indicate exons interpreted as deleted

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

Classification	Number of families/patients	Mutations in <i>BRCA1</i> (%)	BRCAPro mean (\pm SD) Range
High-risk families	344	86 (25.0)	0.229 (\pm 0.269) 0.001–0.975
Sporadic cases	311	28 (9.0)	0.086 (\pm 0.122) 0.001–0.838
Overall	655	114 (17.4)	0.162 (\pm 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 *AluY* 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 *AluSx* and *AluJb* sequences located in introns 3 and 10, respectively. Inserted fragment corresponded to the reverse complement of the sequence derived from *AluY* repeat located in intron 3 of *BRCA1* (g.18725–18759). Breakpoints were located in a sequence comprising 10 identical nucleotides within *AluSx* (g.17686–17695) and *AluY* (g.18760–18769) repeats in intron 3 and a stretch of 29 identical nucleotides located in the *AluY* (g.18696–18724) and *AluJb* (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

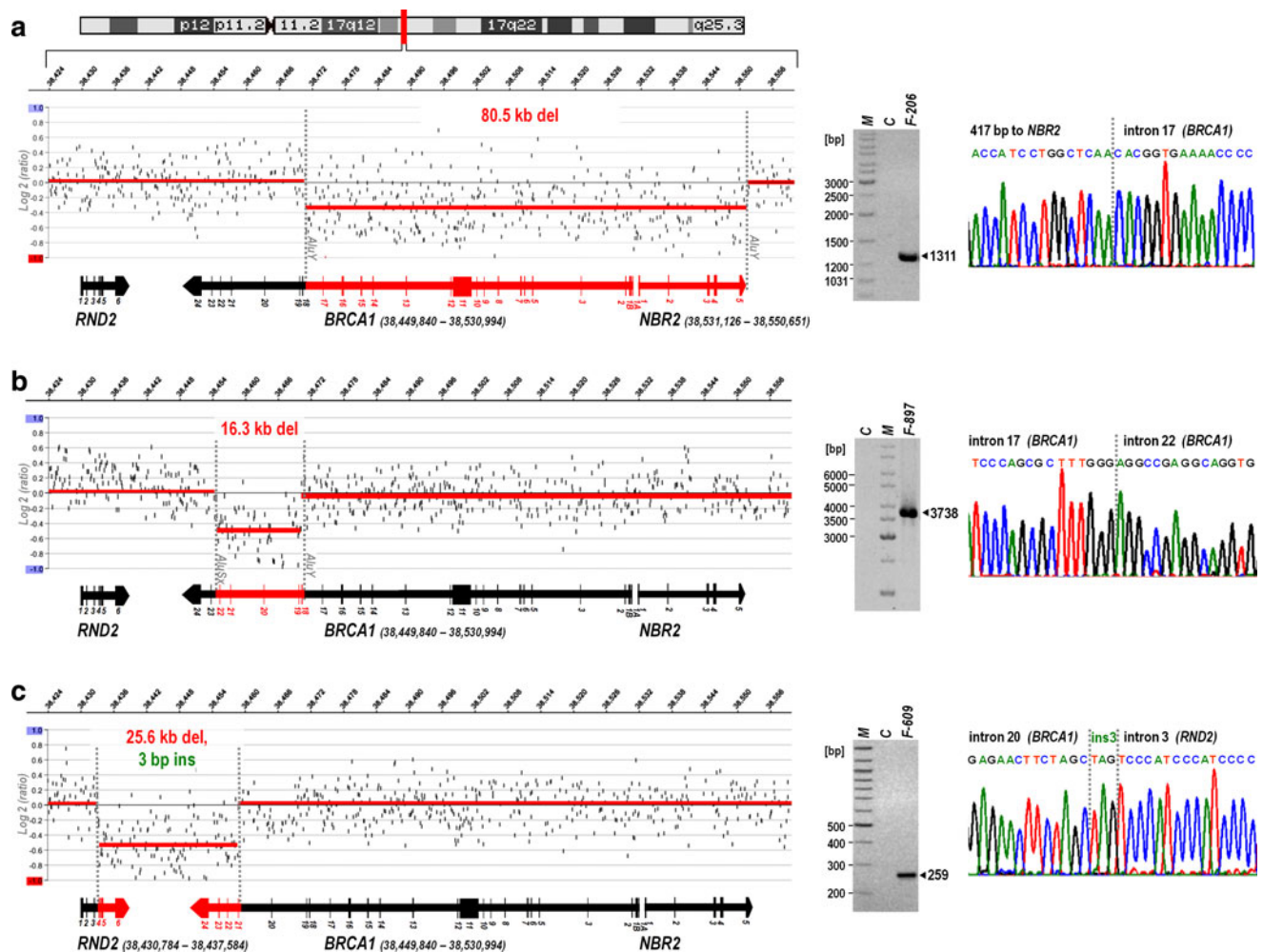


Fig. 2 Breakpoint analysis of three novel genomic rearrangements. *Left*—copy number analysis at the *BRCA1* locus by aCGH. The y-axis indicates log₂ ratios of Cy5/Cy3 fluorescent intensity. *Red lines* represent the results of segMNT analysis. Deleted regions are shown by *lower red lines*. The schemes 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 *AluY* and *AluSx* 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

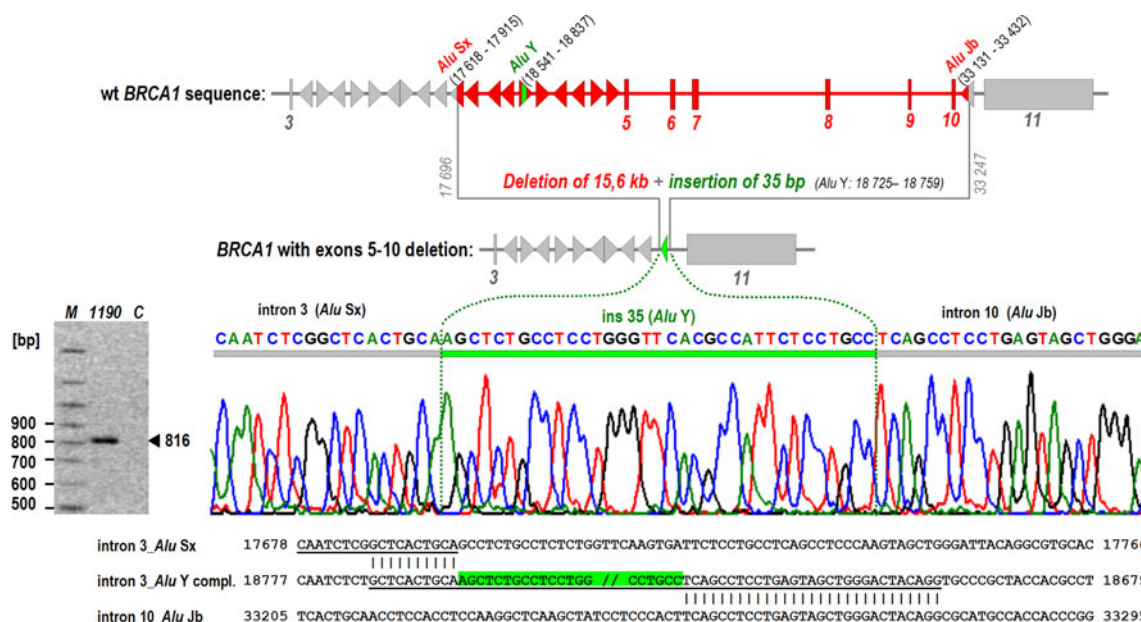
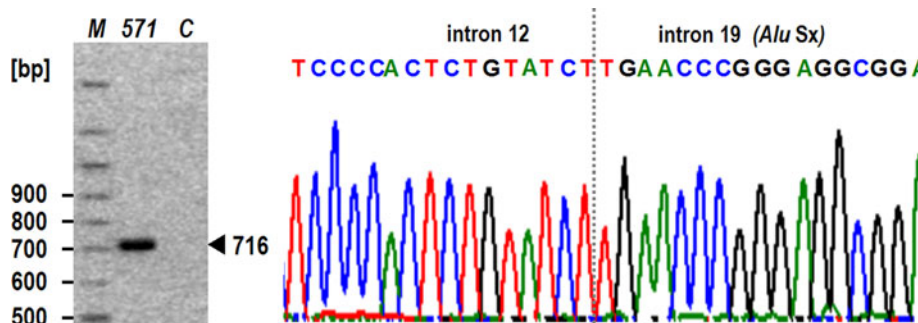


Fig. 3 Breakpoint analysis of a complex genomic rearrangement comprising deletion of exons 5–10 and insertion of 35 nucleotides using LR-PCR (left) and sequencing (right). The carrier of the deletion is indicated by a number; lane C—negative control; lane M—size standards. Breakpoints verified by sequencing 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 microsatellite 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 ψ *BRCA1* 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 ~ 160 bp) and whole-genome aCGH (median probe spacing ~ 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 Halhuber 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

- 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
- 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
- Mateju M, Stribrna J, Zikan M, Kleibl Z, Janatova M, Kormunda S, Novotny J, Soucek P, Petruzela L, Pohlreich P (2010) Population-based study of BRCA1/2 mutations: family history based criteria identify minority of mutation carriers. *Neoplasma* 57(4)
- Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Pruntel R, Regnerus R, van Welsem T, van Spaendonk R, Menko FH, Kluijdt 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
- Mazoyer S (2005) Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* 25:415–422
- 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
- 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
- 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
- Hansen TV, Jonson L, Albrechtsen A, Andersen MK, Ejlersten 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Pylkas K, Erkkö 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
- Staa 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Zikan M, Pohlreich P, Stribrna J, Kleibl Z, Cibula D (2008) Novel complex genomic rearrangement of the BRCA1 gene. *Mutat Res* 637:205–208
- Bartunkova H, Foretova 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 u zdravé osoby ze 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 Harsseel 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://research.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, Mailet P, Philippe C, Lortholary A, Gesta P, Bezieau S, Toulas C, Gladiéff 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