

Analýza mutácií mismatch-repair génov asociovaných s Lynchovým syndrómom u pacientov s rakovinou prsníka

Mgr. Lucia Krasničanová
(patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.
Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava

Úvod

Lynchov syndróm (LS) je autozomálne dominantné dedičné ochorenie, pri ktorom je typicky pozorovaná mutácia v niektorom z mismatch-repair (MMR) génov zodpovedných za reparáciu chybné inkorporovaných nukleotidov počas replikácie DNA (1), čo vedie k hromadeniu mutácií v genóme jedinca, pričom k najvýraznejšiemu prejavu dochádza v krátkych repetitívnych sekvenciách tvoriacich mikrosatelity (2). Približne 90% mutácií je lokalizovaných na MMR génoch MLH1 a MLH2 a približne 10% na génoch MSH6 a PMS2. Ľudia, ktorí sú nosičmi mutácií v týchto génoch majú zvýšené najmä riziko vzniku kolorektálneho karcinómu (CRC) a endometriálneho karcinómu, pričom nástup ochorenia býva v mladšom veku než je štatistický priemer. Mutácie v MMR génoch však vedú aj k zvýšenému riziku nádorov vaječníkov, tenkého čreva, urotelu, obličiek, mozgu, pečene, žľazových ciest a žalúdka, ktoré spoločne nazývame aj nádory asociované s LS (3). Štúdia z roku 2018 poukázala aj na prepojenie medzi Lynch asociovanými génmi MSH6 a PMS2 a rakovinou prsníka (4).

Vzhľadom na široké spektrum nádorových ochorení, ktoré môžu mutácie v Lynch asociovaných génoch spôsobovať, sa často pri jednotlivých nádorových ochoreniach neuvažuje o diagnóze Lynchovho syndrómu, čo vedie k tomu že sa diagnostika tohto ochorenia nerobí. Súčasná diagnostika prebieha najmä u jedincov, u ktorých sa vyskytuje aktuálne nádorové ochorenie, najmä kolorektálneho karcinómu a to hlavne v mladšom veku, než je priemerný vek nástupu ochorenia, prípadne, ak je v rodine viacero členov postihnutých nádormi asociovanými s Lynchovým syndrómom alebo v prípade že je v rodine postihnutých viacero generácií jedným typom nádorového ochorenia (5).

Vzorky nádorového tkaniva sú testované pomocou imunohistochemie, kde zistíme prítomnosť proteínových produktov menovaných MMR génov. Druhým spôsobom diagnostiky je testovanie mikrosatelitovej instability. Pozitívne výsledky týchto testov indikujú malfunkciu v génoch asociovaných s Lynchovým syndrómom avšak na základe týchto testov nie sme schopní povedať či má pacient LS, keďže k mutácii spomínaných génov mohlo dôjsť len v bunkách nádorového tkaniva (5). Ľudia s LS však majú mutácie spomínaných génov vo všetkých bunkách svojho organizmu. Preto je potrebné pre diagnostikovanie Lynchovho syndrómu vyšetriť krvnú vzorku pacienta a zistiť, či sa mutácie MMR génov vyskytujú v celom organizme (www1).

Vzhľadom na fakt, že podľa GLOBOCAN 2018 sa Slovensko podľa odhadov umiestnilo v rebríčku incidencie v prepočte na 100 000 obyvateľov v prípade CRC na treťom mieste a v prípade EC na deviatom mieste (6), stojí za úvahu, zvážiť na Slovensku genetické testovanie mutácií génov MMR pre účely diagnostiky LS u pacientov so spomenutými nádorovými ochoreniami. Keďže ako už bolo spomenuté, diagnostika LS sa vykonáva väčšinou len pri CRC, často nie je LS odhalený pri iných nádorových ochoreniach. Vzhľadom na fakt, že rakovina prsníka je podľa odhadov poslednej celosvetovej štatistiky GLOBOCAN 2018 všeobecne druhou

najčastejšie diagnostikovanou formou rakoviny a najčastejšie diagnostikovanou formou rakoviny u žien a štvrtou najčastejšou príčinou smrti v dôsledku nádorových ochorení (6), stojí určite za zmienku výskum mutácií Lynch asociovaných génov u takýchto pacientok. Na začiatok sme sa rozhodli analyzovať nádorové tkanivo 35 pacientov pre účel analýzy frekvencie mutácií v MMR génoch u pacientov s potvrdeným nádorovým ochorením prsníka.

Materiál a metódy

Pre účely tejto práce sme použili vzorky nádorového tkaniva prsníka, odobraté počas operácie a následne uskladnené v tekutom dusíku.

Pri práci sme použili tieto chemikálie:

NaOH

EtOH

DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)

Kit SureSelect^{QXT} (Agilent Technologies)

Agilent High Sensitivity DNA Kit, (Agilent Technologies)

Qubit^R dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)

MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina)

Nádorové tkanivo sme homogenizovali v tekutom dusíku v trech miskách pomocou mažiara. Následne sme izolovali DNA z nádorového tkaniva pomocou kitu DNeasy Blood & Tissue Kit. Kvalitu izolácie a prípadné znečistenie organickými látkami a proteínmi sme si overili zmeraním koncentrácie nukleových kyselín pomocou spektrofotometra NanoDrop 1000. DNA knižnicu pre následné sekvenovanie sme si pripravili použitím kitu na prípravu knižníc SureSelect^{QXT}, ktorý umožňuje vychytanie a obohatenie úsekov analyzovaných génov. Následne sme si kvalitu vytvorenej DNA knižnice overili prístrojom Agilent 2100 Bioanalyzer pričom sme použili kit Agilent High Sensitivity DNA Kit. Kvantitu dvojvláknovej DNA vo vytvorenej DNA knižnici sme stanovili fluorimetrom Qubit 2.0 pomocou kitu Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit. Analyzované vzorky sme sekvenovali pomocou sekvenátora Illumina MiSeq s využitím kitu MiSeq Reagent Kit v3. Patogénne varianty vo vzorkách sme následne analyzovali.

Výsledky

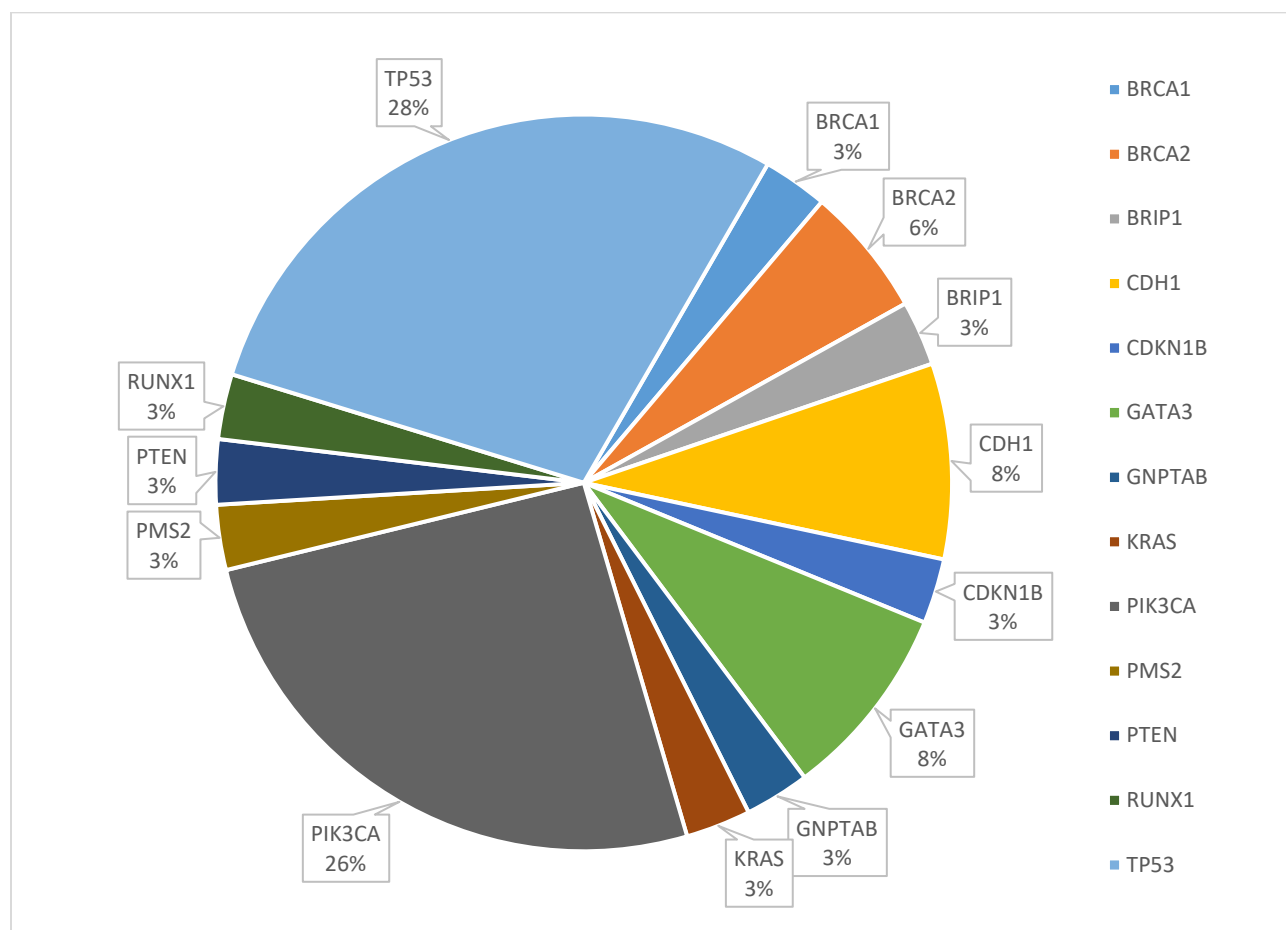
Pri analýze variantov nachádzajúcich sa v nádorovom tkanive sme detegovali množstvo mutácií v génoch asociovaných so vznikom rakoviny prsníka. Naším hlavným cieľom bolo zamerať sa na detekciu mutácií asociovaných s Lynchovým syndrómom, teda podľa publikácie od Roberts et al. (2018) mutácií v génoch MSH6 a PMS2. Podarilo sa nám identifikovať jednu mutáciu v géne PMS2, čo predstavuje v našom prípade 2,85% spomedzi všetkých analyzovaných vzoriek respektíve 3,33% spomedzi vzoriek, v ktorých sme detegovali patogénne a pravdepodobne patogénne varianty (Graf 1). V géne MSH6 sa nám nepodarilo v skúmaných vzorkách

identifikovať ani jednu mutáciu. Ostatné detegované relevantné mutácie spojené so vznikom rakoviny prsníka sú uvedené v Tabuľke č. 1. V 5 vzorkách nádorového tkaniva sa nám nepodarilo identifikovať patogénne alebo pravdepodobne patogénne varianty v analyzovaných génoch.

Tabuľka č. 1 Identifikované relevantné patogénne (P) a pravdepodobne patogénne (LP) varianty identifikované vo vzorkách nádorového tkania (KV – klasifikácia variantu)

Číslo vzorky	chr.	pozícia	typ variantu	oblasť génu	názov génu	transkripčný variant	proteínový variant	KV
1	16	68772218	SNV	5'UTR; exón	CDH1	c.67C>T	p.Q23*	P
2	10	8115874	inzercia	exón	GATA3	c.1223_1224 insA	p.P409fs	LP
3	17	7578291	SNV	zostrih. miesto	TP53	c.560-2A>C	x	P
4	17	7577106	SNV	exón	TP53	c.832C>T	p.P278S	P
5	17	7578176	SNV	zostrih. miesto	TP53	c.672+1G>T	x	P
6	17	7577099	SNV	exón	TP53	c.839G>A	p.R280K	P
7	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
8	3	178921553	SNV	exón	PIK3CA	c.1035T>A	p.N345K	P
9	17	7578414	delécia	exón	TP53	c.516delT	p.V173*	LP
10	17	7577559	SNV	exón	TP53	c.722C>T	p.S241F	P
11	17	7578406	SNV	exón	TP53	c.524G>A	p.R175H	P
12	10	8115874	inzercia	exón	GATA3	c.1224dupG	p.P409fs	LP
13	13	32930673	SNV	exón	BRCA2	c.7544C>T	p.T2515I	LP
14	17	7578397	delécia	exón	TP53	c.517_533del GTGAGGCGCT GCCCCCA	p.V173fs*2	LP
15	13	32907420	inzercia	exón	BRCA2	c.1813dupA	p.I605fs*11	P
15	12	102147248	delécia	exón	GNPTAB	c.3503_3504 delTC	p.L1168fs*5	P
16	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>T	p.H1047L	P
17	17	59853848	inzercia	exón	BRIP1	c.2010dupT	p.E671*	P
17	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
18	7	6036982	delécia	exón; ncRNA; 5'UTR	PMS2	c.769_778del TTGAGCTGTT	p.L257fs*47	LP
18	17	7579315	SNV	promótor; exón	TP53	c.372C>A	p.C124*	P
18	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
19	17	7578402	SNV	exón	TP53	c.528C>G	p.C176W	LP
20	12	25398284	SNV	exón	KRAS	c.35G>C	p.G12A	P
21	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
22	12	12870861	delécia	exón	CDKN1B	c.88delA	p.R30fs*12	LP
22	10	89720740	delécia	exón	PTEN	c.891_892 delTC	p.D297fs*5	LP

23	17	41243844	delécia	Exón; intrón; ncRNA	BRCA1	c.3700_3704 delGTAAA	p.V1234fs*8	P
24	16	68856016	inzercia	5'UTR; exón	CDH1	c.1643dupC	p.Q549fs*7	LP
25	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
26	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
27	3	178921549	SNV	exón	PIK3CA	c.1031T>G	p.V344G	LP
28	16	68849628	SNV	5'UTR; exón	CDH1	c.1348C>T	p.Q450*	P
29	10	8115749	delécia	exón	GATA3	c.1099delC	p.R367fs*38	LP
30	21	36206812	inzercia	exón	RUNX1	c.612_618dup GCGGCGC	p.T207fs*29	LP



Graf 1. Percentuálne zastúpenie variantov detegovaných v jednotlivých génoch pri našej analýze.

Diskusia

Hoci nádorové ochorenie prsníka nepatrí v prípade Lynchovho syndrómu k tým najčastejším, je určite potrebné poukázať na fakt, že v prípade pacientov, u ktorých má rakovina prsníka familiárny výskyt, môže byť tento zapríčinený aj mutáciou v Lynch asociovaných génoch. V prípade nami

analyzovaných pacientov sme sa nezameriavali na analýzu pacientov s familiárnym výskytom rakoviny prsníka, nakoľko sme sa snažili detegovať výskyt týchto mutácií v bežnej vzorke pacientov s rakovinou prsníka a tak poukázať na výskyt týchto mutácií v bežnej populácii. Cieľom našej práce bolo najmä poukázať na to, že pri analýze náhodných vzoriek pacientov s rakovinou prsníka sa vyskytujú mutácie v MMR génoch. Hoci sa nám podarilo v analyzovanej skupine pacientov identifikovať len jedného pacienta s mutáciou v Lynch asociovaných génoch spojených s rizikom vzniku rakoviny prsníka, je potrebné upozorniť na fakt, že práve mutácie v génoch MSH6 a PMS2 tvoria len 10% mutácií na MMR génoch a zvyšných približne 90% mutácií je lokalizovaných na génoch MLH1 a MLH2 asociovaných prevažne s rizikom vzniku kolorektálneho karcinómu (3), čo znamená, že aj výskyt rakoviny prsníka v súvislosti s LS bude nižší ako v prípade CRC. Hoci by sa mohlo zdať, že diagnostika LS u pacientov s rakovinou prsníka nemá široké využitie analýza od Roberts et al. (2018), kde bolo v skupine vyše 50000 európskych pacientok s rakovinou prsníka identifikovala až 423 prípadov s mutáciou v MMR génoch, pričom najčastejšie to boli už spomenuté mutácie génov MSH6 (33,1%) a PMS2 (29,3%). Tieto čísla naznačujú, že v štúdií s pacientmi, ktorá sa nezameriavala na pacientov s rodinným výskytom bolo identifikovaných približne 0,85%. V našom prípade predstavovalo percentuálne zastúpenie mutácií v MMR génoch 2,85% spomedzi všetkých analyzovaných vzoriek. Pre presnejšie stanovenie percentuálneho zastúpenia mutácií MMR génov u pacientov s rakovinou prsníka by však bola potrebná štúdia na väčšom počte pacientov. Vzhľadom na tento fakt stojí určite za zmienku, aby sa u pacientok s rakovinou prsníka robila genetická analýza, ktorá bude zahŕňať aj analýzu MMR génov, keďže včasné odhalenie nosičstva týchto mutácií môže pacientom pomôcť odhaliť príčinu ochorenia a tiež zvýšiť obozretnosť, kvôli riziku vzniku ďalších Lynch asociovaných nádorových ochorení. Pre potvrdenie diagnózy je však ako bolo vyššie spomenuté, vždy potrebné vyšetriť aj krvnú vzorku pacienta. Keďže LS je hereditárne ochorenie, diagnostikovanie tohto syndrómu môže taktiež pomôcť aj ostatným pokrvným členom rodiny včasne u nich odhaliť LS a upozorniť tak na zvýšené riziko možnosti rozvinutia nádorových ochorení, ktoré predstavuje u ľudí s LS v niektorých prípadoch až 80% a podniknúť potrebné kroky pre skrining takýchto pacientov a následne sa zamerať na preventívne kroky, ktoré môžu pomôcť včasne odhaliť vznikajúce nádorové ochorenie, čo značne zlepšuje vyhliadky pacienta pri terapii rakoviny (7, 8). Pre správnu diagnostiku je potrebné otestovať krv jedinca, keďže len tak je možné stanoviť diagnózu LS. Tento spôsob diagnostiky patrí medzi neinvazívne diagnostické metódy a nepredstavuje pre pacienta zvýšenú stresovú, fyzickú a psychickú záťaž ako je tomu v prípade diagnostiky pomocou biopsie pri už vzniknutom nádorovom ochorení.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES, ITMS 26210120041, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

1. Zumstein V, Vinzens F, Zettl A, Heinimann K, Koeberle D, von Flüe M, Bolli M: Systematic immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal cancer: a single centre experience of 486 patients. *Swiss Med Wkly* 2016; 146: w14315.
2. Vogelsang M: DNA Alterations in Lynch Syndrome, Springer Dordrecht. 2013, 1-195.

3. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S: Cancer Risks Associated With Germline Mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 Genes in Lynch Syndrome. *JAMA* 2011; 305(22):2304-2310.
4. Roberts ME, Jackson SA, Susswein LR a spol.: MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genet Med.* 2018; 20(10): 1167–1174.
5. Duraturo F, Liccardo R, De Rosa M, Izzo P: Genetics, diagnosis and treatment of Lynch syndrome: Old lessons and current challenges. *Oncol Lett* 2019; 17(3): 3048–3054.
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA CANCER J CLI* 2018; 68:394-424.
7. Strafford JC: Genetic Testing for Lynch Syndrome, an Inherited Cancer of the Bowel, Endometrium, and Ovary. *Rev Obstet Gynecol* 2012; 5(1):42-49.
8. Ramsoekh D, Wagner A, van Leerdam ME, Dooijes D, Tops CMJ, Steyerberg EW, Kuipers EJ: Cancer risk in MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers; different risk profiles may influence clinical management. *Hered Cancer Clin Pract* 2009; 7(1): 17.

www1:<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/lynch-syndrome/diagnosis-treatment/drc-20374719>