

Analiza mutacij na genih BRCA 1 in BRCA 2 pri slovenskih družinah z rakom dojke in jajčnika

Mateja Krajc, Marko Hočevar

UVOD

V začetku leta 2001 smo na Onkološkem inštitutu v Ljubljani pričeli z onkološkim genetskim svetovanjem osebam oz. družinam, pri katerih sumimo, da gre za dedno obliko raka. Pri veliki večini oseb, ki so obiskale to ambulanto, je šlo za sum, da gre za dedno obliko raka dojke in jajčnikov. Omenjeni vrsti raka predstavljata poleg raka širokega črevesa in danke najpogostejšo vrsto dednega raka. V prispevku bomo opisali svoje izkušnje z onkološkim genetskim svetovanjem pri dednem raku dojke in jajčnikov.

Dedni rak dojke in jajčnikov večinoma povzročata mutirana tumorska supresorska gena BRCA 1 in BRCA 2. Ogroženost za nastanek raka dojke je pri nosilcih mutiranih genov BRCA 1 ali BRCA 2 (pri slednjem tudi pri moških) zelo velika, saj do 70. leta starosti znaša 60–80 odstotkov. Ob tem je treba poudariti, da je splošna, doživljenjska ogroženost žensk za nastanek raka dojke v Sloveniji 5,5 %. Tudi ogroženost za nastanek raka jajčnikov je pri nosilkah mutacij večja in znaša 30–40 odstotkov pri mutaciji gena BRCA 1 (do 70. leta starosti) in 20 odstotkov pri mutaciji gena BRCA 2. Mutacije omenjenih genov so povezane tudi z večjo ogroženostjo za nastanek nekaterih drugih vrst raka; BRCA 1 povezujemo z nastankom raka širokega črevesa, BRCA 2 pa z nastankom raka trebušne slinavke, ustne votline, želodca in prostate (1). Od prve identifikacije in kloniranja obeh genov so znanstveniki vpisali v bazo podatkov BIC (Breast Cancer Information Core) že več kot 3700 različnih predispozirajočih mutacij, ki se pojavljajo po vsej dolžini obeh genov. Največkrat se določen tip mutacije pojavlja le v neki družini. Pri nekaterih skupinah ljudi pa se specifična mutacija lahko pojavlja večkrat v različnih družinah. Imenujemo jo mutacija founder. Do sedaj so jo največkrat odkrili pri aškenazi Judih, Islandcih in Nizozemcih. Ta mutacija zelo poenostavi in poceni genetsko testiranje, kadar je v neki populaciji dovolj pogosta.

METODE

Bolniki

V prvih mesecih delovanja ambulante za onkološko genetsko svetovanje smo aktivno vabili ženske, ki so redno hodile v ambulanto Centra za bolezni dojke na Onkološkem inštitutu in so imele tudi obremenjujočo družinsko anamnezo z vsaj dvema sorodnicama v prvem/drugem kolenu, ki sta imeli raka na dojkah/jajčnikih. Po nekaj mesecih pa so splošni zdravniki, ginekologi ali pa bolnice same tolikokrat odločili za svetovanje, da smo prenehali aktivno vabiti. Le vse moške z rakom dojke smo povabili pisno.

Napotitev v ambulanto za onkološko genetsko svetovanje je indicirana, kadar gre za rak dojke pred 40. letom, bilateralni rak dojke ali rak dojke in jajčnikov, kadar gre za moškega z rakom dojke oziroma če je pozitivna družinska anamneza: sorodnica v prvem kolenu z rakom dojke pred 40. letom, sorodnik v prvem kolenu z rakom dojke, sorodnica v prvem kolenu z bilateralnim rakom dojke, dve sorodnici v prvem/drugem kolenu z rakom dojke pred 60. letom ali z rakom jajčnikov ne glede na starost, tri sorodnice v prvem ali drugem kolenu z rakom dojke ali jajčnikov ne glede na starost.

Vsem osebam, ki pridejo na svetovanje, vnaprej pošljemo formular, na podlagi katerega ustvarimo rodovnik, ter v laičnem jeziku napisano informacijo o dednem raku dojke in jajčnikov. Rodovnik omogoči izračun, kolikšna je verjetnost mutacije pri neki osebi/družini, še preden ta pride na prvo svetovanje. Ker se na podlagi vnaprej prebranih informacij o dednem raku pripravi tudi bolnik, je svetovanje močno olajšano.

Pri vseh osebah z več kot 10 % verjetnostjo mutacije genov BRCA 1/BRCA 2 predlagamo genetsko testiranje. Preden naredimo test, preiskovana oseba privoli in podpiše, da se strinja s testiranjem, potem pa ji vzamemo vzorec venske krvi, da iz levkocitov izoliramo in analiziramo dedni zapis, na podlagi katerega ugotovimo, ali gre za mutacijo na genih BRCA 1 ali BRCA 2.

Analiza mutacij

Ker sta gena BRCA 1 in BRCA 2 velika, mutacije iščemo z različnimi presejalnimi testi. Tako uporabljamo na velikih eksonih obeh genov (ekson 11 na BRCA 1 in eksona 10 in 11 na BRCA 2) PTT-test (Protein truncation Test), kot ga je opisal F. B. L. Hoegervorst s sodelavci (2). Druge manjše eksone obeh genov in konca 5' in 3' velikih eksonov pa analiziramo s F-CSGE-testom (Fluorescence based Conformation Sensitive Gel Electrophoresis), kot ga je opisal Ganguly s sodelavci (3). Dobljene PCR-fragmente nato analiziramo na sekvencionerju (ALF express automatic sequencer – Pharmacia). Vzorci, ki pokažejo nenormalne vrhove, kar kaže na prisotnost heterodupleksov (ki nakazujejo mutacijo ali polomorfizem), pozneje sekvencioniramo (Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit – USB) in ugotavljamo tip mutacij.

Mutacijo founder pa testiramo s hitro metodo za ugotavljanje ponavljajoče se mutacije, ki temelji na PCR. Uporabljamo poseben modificiran primer, ki ustvari specifično restrikcijsko mesto v divjem tipu fragmenta, ne pa v mutiranem PCR-fragmentu. Po encimski restrikciji se DNA kontrolne skupine pacientov po elektroforezi na agaroznem gelu oblikuje v enojne trakove (oba alela sta odrezana), medtem ko se DNA nosilec mutacij po

elektroforezi oblikuje v dva trakova; poleg navadno dolgega traku imamo še dodatnega, ki je daljši (alel divjega tipa je odrezan, mutirani alel pa ne).

Napake spojitve obeh alelov, ki nastanejo pri nosilcih mutacij, potrđimo s sekvenčno analizo RNA-vzorcev, izoliranih iz levkocitov.

Da bi ugotovili, ali gre pri ponavljajoči se mutaciji v resnici za mutacijo founder, smo za odvzem krvi prosili tudi sorodnike nosilcev mutacije. Vzorce smo alizirali s polimorfnimi označevalci (D13S310, D13S1695, D13S1698, D13S171) – haplotipizacija (4).

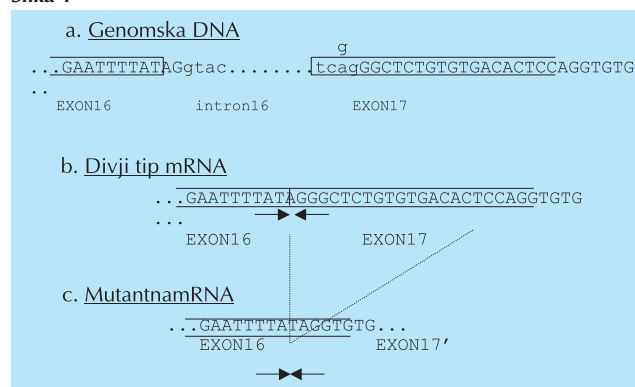
REZULTATI IN DISKUSIJA

V 18 mesecih smo svetovali 158 osebam (140 ženskam, 18 moškimi). Kar 80 % vabljenih je bilo pripravljenih, da se svetovanja udeležijo. To je v nasprotju s podatki v literaturi, po katerih je pripravljenost navadno le 25–30 %. Glavni razlog za to je pri osebah na Zahodu verjetno strah pred izgubo delovnega mesta in zdravstvenega zavarovanja. 54 osebam smo predlagali genetski test na prisotnost mutacij v genih BRCA 1 in BRCA 2 in ga tudi opravili. Ob pisanju prispevka še nimamo končnih rezultatov za vse. Trenutno lahko poročamo o 10 odkritih mutacijah gena BRCA 2 v skupno 5 različnih družinah in o 2 primerih mutacije gena BRCA 1 v dveh družinah. Pri vseh 10 mutacijah gena BRCA 2 gre za isto mutacijo IVS16-2 A > G, za katero se je izkazalo, da je mutacija founder.

Ker predstavlja temelj vseh poznejših rezultatov poglobljena začetna laboratorijska analiza prvih sedmih družin, ki jo je opravila dr. Mateja Krajc v sodelovanju z Laboratorijem onkološke genetike Svobodne univerze v Bruslju (Vrije Universiteit Brussel), bomo v nadaljevanju nekoliko izčrpnje poročali o prvih sedmih družinah (5). Vse so imele bremenilno družinsko anamnezo in so ustrezale našim in belgijskim merilom za testiranje BRCA 1/2 (Tabela 1). Glede

na belgijske izkušnje in izsledke v literaturi smo pričakovali, da bomo izolirali dve do tri mutacije, predvsem v družinah, v katerih se pojavlja poleg raka dojke tudi rak jajčnika. Nepričakovano pa PTT-test, s katerim so v Belgiji našli večino predispozicijskih mutacij, pri slovenskih družinah ni pokazal okvare na genih BRCA 1/2. Testiranje smo zato razširili še na manjše eksone obeh genov ter na konca 3' in 5' velikih eksenov, in sicer z metodo F-CSGE; pokazali so se nenormalni vrhovi, ki so kazali na heteroduplekse DNA petih PCR-fragmentov. Poznejše sekvencioniranje teh petih PCR-fragmentov pa je pokazalo prisotnost običajnega polimorfizma, o katerem so že poročali v podatkovno bazo BIC (IVS7-34C > T na BRCA 1 in 203A > G, IVS8 + 56C > T, IVS14 + 53C > T, IVS16-14T > C na BRCA 2). Vseeno pa smo poleg omenjenega polimorfizma v fragmentu, ki pokriva ekson 17 na genu BRCA 2, pri enem pacientu našli mutacijo (IVS16-2A > G, Slika 1). Zaradi polimorfizma v

Slika 1



Legenda Slike 1:

(a) Mutacija na genu BRCA 2 (IVS16–2A > G) je bila ugotovljena pri treh družinah. Normalne mRNA (b) in tudi molekule brez prvih 20 nukleotidov eksona 17 (c) smo našli v limfocitih nosilcev mutacij. Prepis skrajšanih mRNA pa pri nosilcih te mutacije privede do nastanka krajših (nenormalnih) molekul BRCA 2.

Tabela 1: Karakteristike prvih sedmih slovenskih družin, pri katerih smo opravili testiranje BRCA 1/2

DRUŽINA	1	2	3	4	5	6	7
Število bolnikov z rakom dojke	4	6	7	1	4	2	3
Starost ob diagnozi	45-47-65-73	NP	43-44-50-50-60-60-61	44	43-44-63-71	28-42	36-51-60
Število bolnic z rakom jajčnika	0	0	3	1	1	0	0
Starost ob diagnozi	-	-	45-60- NP	79	46	-	-
Prisotnost raka dojke in jajčnika pri istem bolniku	0	0	3	0	0	0	0
Število bolnic z bilateralnim rakom dojke	1	0	0	0	0	0	0
Število bolnikov z drugim malignim obolenjem	1 rak testisov	0	0	1 kolorektalni rak	0	0	1 pljučni rak

NP = ni podatka

posameznem PCR-fragmentu, ki otežuje interpretacijo rezultata, dobljenega s F-CSGE-analizo, smo pri vseh sedmih pacientih opravili dodatno neposredno sekvencioniranje eksona 17 na genu BRCA 2. Tako smo to mutacijo (IVS16-2A > G) odkrili še pri članih dveh drugih družin, kjer metoda F-CSGE ni pokazala nobenega heterodupleksa. Poskus smo ponovili na več vzorcih in odkrili, da ni nobene povezave med genotipom in profilom vrha (ki naj bi pri metodi F-CSGE nakazal heterodupleks, torej mutacijo), kar pomeni, da je metoda F-CSGE premalo občutljiva in nereproducibilna za ugotavljanje mutacij na eksonu 17 gena BRCA 2. Tako smo za odkrivanje te specifične mutacije na eksonu 17 uvedli hitro, natančno in reproducibilno metodo z uvedbo testa, ki temelji na restrikciji PCR-fragmenta (kot je opisano v metodah).

Prav tako lahko pokažemo, da prvih 20 nukleotidov eksona 17 na mRNA mutiranega BRCA 2 alela v treh družinah manjka, kar je posledica napačnega prepisa z genomske DNA na mRNA (Slika1). V nasprotju s tem pri osmih kontrolnih vzorcih tega primanjkljaja nismo opazili.

Zanimivo je, da smo opisano mutacijo našli izključno pri družinah, v katerih se pojavlja le rak dojk, kar je v skladu z opisano literaturo. Seveda pa bomo našo hipotezo, da je mutacija IVS16-2A > G predispozirajoča izključno za rak dojk, lahko potrdili le z analizo večjega števila družin. Ta informacija nam bo v veliko pomoč pri onkološkem genetskem svetovanju, predvsem pri razporedu in tipu kontrolnih pregledov bolnikov in tudi njihovih zdravih sorodnikov, ki so mutacijo podedovali, zboleli pa niso. Prav tako nam bodo izsledki te raziskave lahko pomagali pri raziskovanju molekularnih mehanizmov, odgovornih za nastanek rakaste celice pri nosilcih te specifične ponavljajoče se mutacije.

V podatkovni bazi BIC je mutacija IVS16-2A > G opisana le trikrat. Dvakrat so jo našli pri Myriadu, in sicer pri Američanih, ki izvirajo iz Zahodne Evrope, enkrat pa jo je v bazo vnesel dr. M. Santarosa iz Aviana, italijanskega mesta, ki je od slovenske meje oddaljeno manj kot 100 kilometrov. To lahko kaže, da izolirana mutacija izvira in se širi v populaciji, ki je živela in še živi na območju sedanje Slovenije. Hipotezo učinka founder smo potrdili s polimorfnimi označevalci ob genu BRCA 2 (Tabela 2).

Podobno ugotavljajo tudi Nizozemci; med njihovim prebivalstvom se pojavljata dve mutaciji founder na genu BRCA 1, ki pokrivata približno 36 odstotkov vseh mutacij

na genu BRCA 1. Nobena od teh dveh mutacij ni bila odkrita pri belgijskih družinah, kar kaže, da se te mutacije lahko obdržijo na zelo majhnem območju.

Op.: V skupini za Onkološko genetsko svetovanje sodelujejo še Nikola Bešič, Janez Žgajnar, Marjetka Uršič Vrščaj, Cvetka Bilban Jakopin, Srdjan Novaković in Katarina Lokar.

Literatura:

1. Ford D, Easton DF, Stratton M et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 676–89.
2. Hogervorst FB, Cornelis RS, Bout M et al. Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat Genet* 1995; 10: 208–12.
3. Ganguly T, Dhulipala R, Godmilow L and Ganguly A. High throughput fluorescence-based conformation-sensitive gel electrophoresis (F-CSGE) identifies six unique BRCA2 mutations and an overall low incidence of BRCA2 mutations in high-risk BRCA1-negative breast cancer families. *Hum Genet* 1998; 102: 549–556.
4. Neuhausen S, Godwin A, Gershoni R et al. Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent BRCA-2 mutations in 111 families: results of an international study. *American J Hum Genet* 1998; 62: 1381–88.
5. Goelen G, Teugels E, Bonduelle M, Neyns B and De Grève J. High frequency of BRCA 1/2 mutations in 42 Belgian families with a small number of symptomatic subjects. *Journal of Medical Genetics* 1999; 36: 304–8.

Tabela 2: Rezultati analize haplotipov, ki je bila opravljena na enem bolniku iz vsake družine, v kateri smo uporabili pet različnih STR-označevalcev ob lokusu BRCA 2

Družina	IVS16-2A > G	D13S310	D13S1695	D13S171	D13S1697
1	ne	3/4	5/6	1/6	3/4
2	da	1/4	1/9	1/1	1/3
3	ne	1/1	5/6	1/6	1/3
4	ne	1/2	1/6	1/1	1/9
5	ne	2/4	5/8	1/1	3/4
6	da	3/4	6/9	1/1	3/3
7	da	3/4	6/9	1/1	3/9

Haplotiope, povezane z obolevanjem, smo lahko rekonstruirali pri treh družinah z mutacijo (rezultati niso prikazani). Kot je razvidno iz tabele, imajo vse tri družine z mutacijo haplotip 4-9-1-3.

