

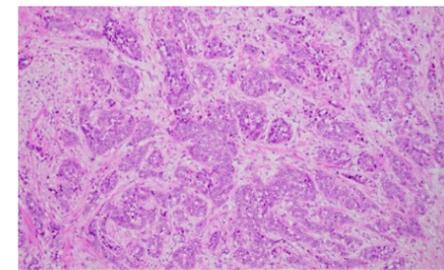


Bei *medica*

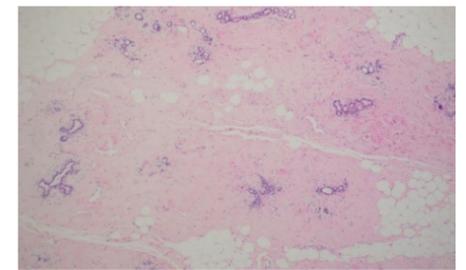
**Ein Blick in die Gene:
Identifikation pathogener
Varianten bei erblich
bedingtem Brust- und
Eierstockkrebs**

im Einsatz

Dr. sc. nat. Jacqueline Ebnetter
Devrim Gezer (M.Sc.)
Corinne Wimmer (M.Sc.)



Mamma-Karzinom



Gesundes Mamma-Gewebe

In der Schweiz werden jährlich 6'200 neue Fälle von Brustkrebs bei Frauen und 50 neue Fälle bei Männern diagnostiziert¹. Somit ist Brustkrebs die häufigste Form von Krebs bei Frauen, bei Männern hingegen selten. Eierstockkrebs trägt gemäss Krebsliga Schweiz mit 600 Neuerkrankungen pro Jahr zu 3% aller Krebserkrankungen bei Frauen bei. Die allermeisten Fälle dieser zwei Formen von Krebs entstehen sporadisch, treten also zufällig und ohne erkennbaren Grund

auf. Lediglich 5-10% der Brustkrebs² und 20-25% der Eierstockkrebs³ sind erblich bedingt und führen somit zur Diagnose «Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) Syndrome». Die schweizerische Arbeitsgemeinschaft für klinische Krebsforschung (SAKK) hat eine Liste von Kriterien publiziert, die auf eine das HBOC-Risiko steigernde Genveränderung und somit auf erblich bedingten Brust- oder Eierstockkrebs hinweisen⁴.

Krebstyp	Allgemeines Risiko	Risiko für Malignität einer Keimbahn-Variante	
		BRCA1	BRCA2
Brust (Frau)	12%	46%-87%	38%-84%
Eierstöcke	1%-2%	39%-63%	16.5%-27%
Brust (Mann)	0.1%	1.2%	bis zu 8.9%

Tabelle 1: Malignitätsrisiko in Personen mit einer pathogenen BRCA1 oder BRCA2 Keimbahn-Variante im Vergleich zum Hintergrundrisiko für Brust- und Eierstockkrebs.

Die allgemeine Populationsfrequenz von pathogenen BRCA1/2 Varianten beträgt ca. 1:400⁵. Die folgende Tabelle von Petrucelli et al. zeigt die krebstyp-spezifischen Risiken für Malignität in Individuen mit einer pathogenen Keimbahn-Variante in BRCA1 oder BRCA2.

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass die Penetranz (Manifestationswahrscheinlichkeit eines Merkmals) dieser pathogenen

BRCA1/BRCA2 Mutationen unvollständig ist. Das heisst, dass nicht jede Person mit einer pathogenen Variante in den genannten zwei Genen zwangsläufig HBOC entwickeln muss. Faktoren wie Epigenetik oder Umwelteinflüsse können das Risiko für eine Manifestation von HBOC beeinflussen.

Das Laboratorium medica überprüft bei Verdacht auf HBOC die Sequenz von BRCA1 und BRCA2 mittels Next-

Generation-Sequenzierung auf auffällige Varianten. Gleichzeitig wird mittels MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) ermittelt, ob die genannten Gene Deletionen oder Duplikationen aufweisen (Abbildung 1). Speziell grössere Deletionen oder Duplikationen (>50bp), welche mittels routinemässigem NGS aufgrund technischer Limitation oft nicht detektiert werden, können somit nachgewiesen werden.

Neben den Varianten in BRCA1 und BRCA2, die nicht für alle HBOC-Fälle verantwortlich sind, gibt es weitere mit HBOC-assoziierte Gene. Das US National Comprehensive Cancer Network (NCCN) hat eine Liste von 17 zusätzlichen Genen publiziert⁶. Häufig wird bei Verdacht auf HBOC die Analyse dieser 17 Gene und BRCA1/BRCA2 kombiniert in einem sogenannten Gen-Panel. Dieses HBOC-Panel («medica hereditary cancer panel») erlaubt die gleichzeitige Sequenzierung aller 19 Gene (Exons und 20bp der flankierenden Introns) mittels Next-Generation-Sequenzierung.

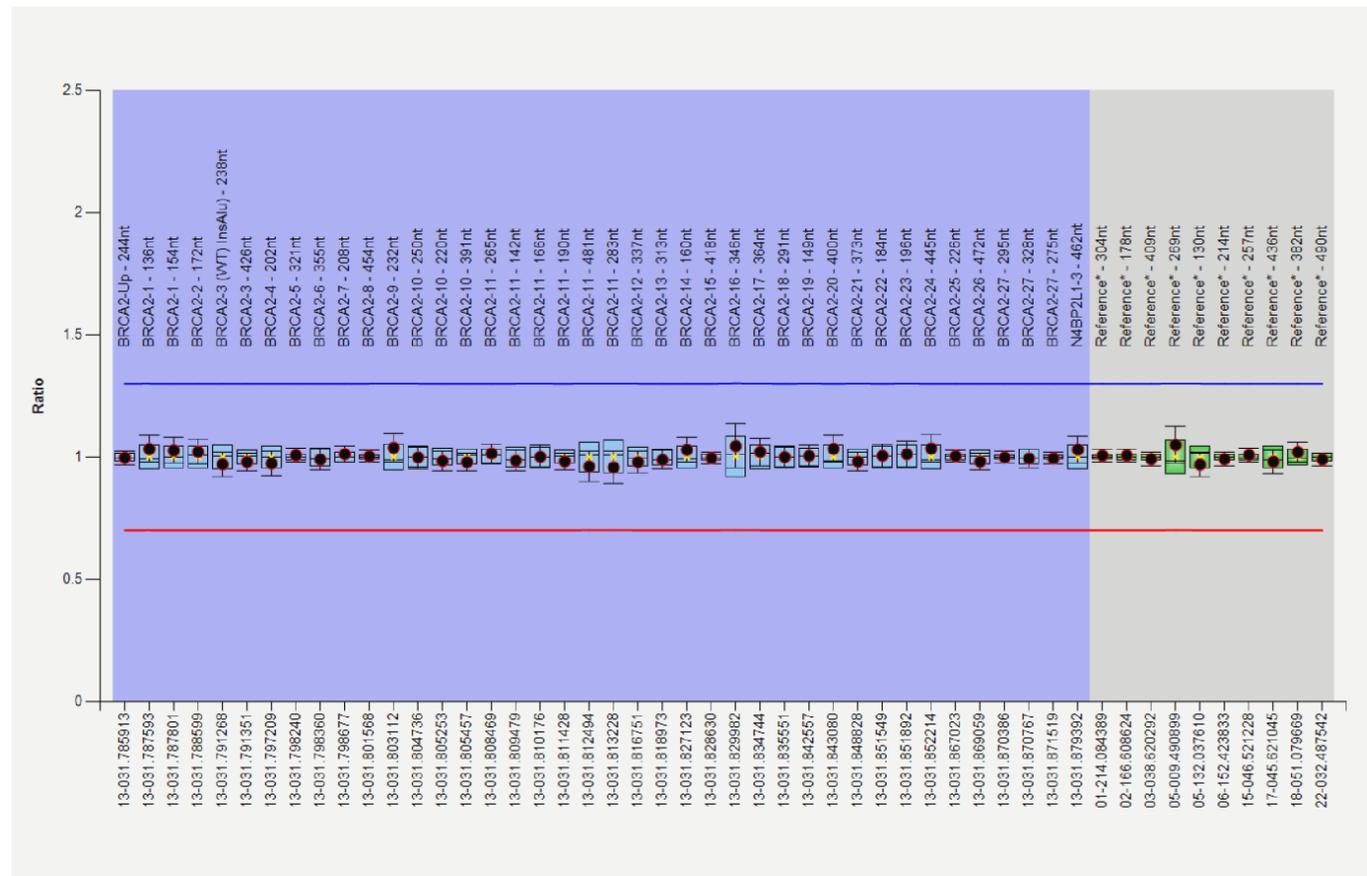


Abbildung 1: MLPA-basierte Copy number variation (CNV, deutsch Kopienzahlvariation) -Analyse zeigt ein unauffälliges Resultat für BRCA2.

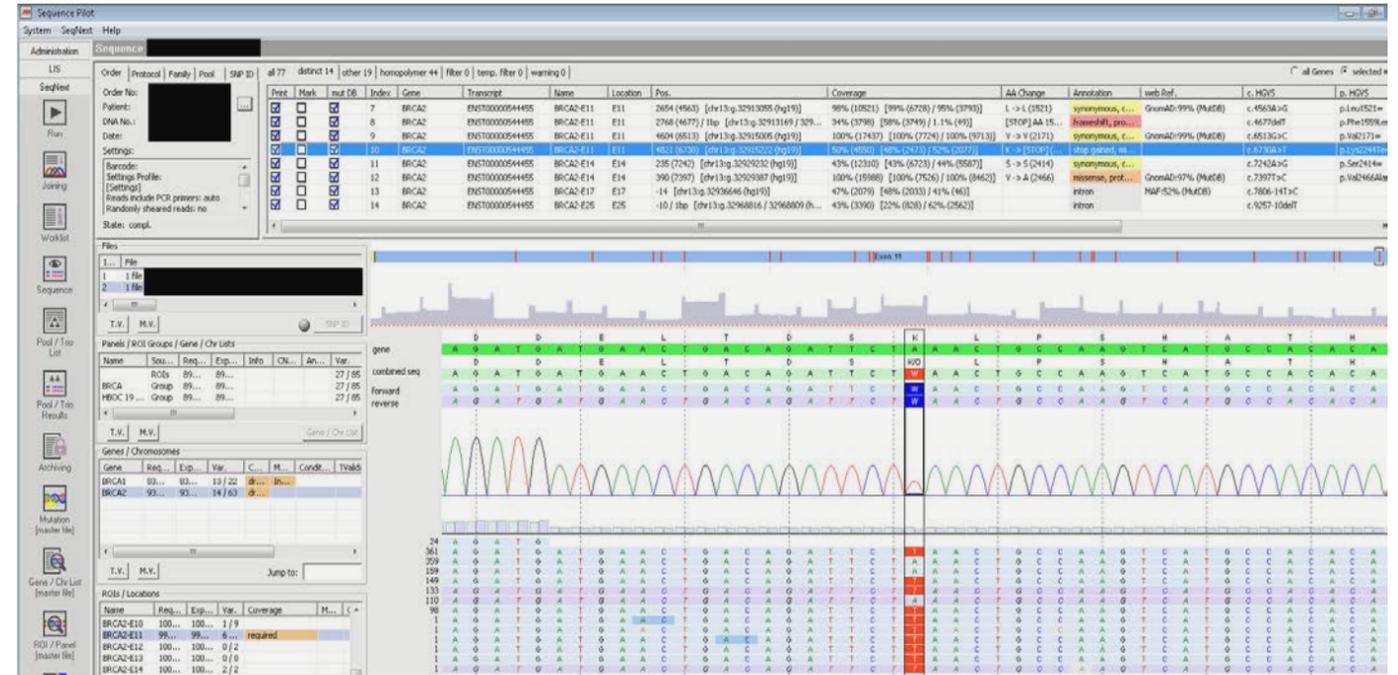


Abbildung 2: Darstellung der Sequenzvariante BRCA2:c.6730A>T, p.(Lys2244Ter) in der Software SEQUENCE PILOT

Mit Hilfe zugehöriger Bioinformatikprogramme (Abbildung 2) lassen sich Abweichungen vom Referenzgenom feststellen und die daraus resultierenden genetischen Varianten, die Basensubstitutionen, -insertionen und -deletionen umfassen, werden gelistet. Die Interpretation dieser Varianten erfolgt durch das qualifizierte Personal. Ziel ist es, die Varianten anhand von verschiedenen gewichteten Kriterien gemäss den ACMG Standards und Guidelines in folgende Kategorien einzuteilen (Abbildung 3)⁷.

Bei einer Variante mit unklarer Signifikanz (VUS) ist die Datenlage oft nicht ausreichend oder zu widersprüchlich, um die Variante als eher benigne oder pathogen zu klassifizieren. Aufgrund der wachsenden verfügbaren Studiendaten, empfiehlt

sich eine erneute Interpretation der VUS zu einem späteren Zeitpunkt (1-2 Jahre). Kommt es zu einer sogenannten Reklassifizierung einer VUS, so zeigt sich bei 90% die Tendenz in Richtung benigne⁸.

Die Klassifikation in die fünf oben ersichtlichen Kategorien erfolgt anhand folgender Punkte:

- Minor allele frequency (MAF):** Wie häufig ist eine Variante in einer gesunden Population vorhanden? Gibt es homozygote Individuen?
- Biologische Konsequenzen:** Um welche Art Mutation (silent, missense, nonsense, frameshift) handelt es sich und welche Auswirkung auf das Protein sind damit verbunden?

- Assoziation mit HBOC:** Wurde ein Zusammenhang in der Literatur beschrieben? Gibt es familiäre Häufungen?
- Klassifikationsvorschläge:** Gibt es Vorschläge zur Klassifikation auf Datenbanken (ClinVar, LOVD, etc.) mit zuverlässigen Quellen?
- in-silico Computertools:** Was sagen verschiedene Tools (z.B. MutationTaster, SIFT, Polyphen2, etc.) bzgl. Auswirkung auf das Protein voraus?
- Pathogenitätsmechanismus und genspezifischer benigner Frequenz-Schwellenwert:** aus der Genstatistik der Datenbank Varsome.
- Vorliegen einer weiteren Variante:** Kann der Phänotyp durch eine andere vorliegende Variante erklärt werden?



Abbildung 3: Klassifikation einer mittels NGS gefundenen Variante in eine der fünf Kategorien.



Eine sorgfältige Analyse erfordert somit die Abschätzung der chemischen und physikalischen und den daraus resultierenden biologischen Konsequenzen der Variante, eine fundierte Literaturrecherche sowie die Berücksichtigung modernster Datenbanken und Computertools. Trotzdem geben die aufgrund der Modell-Algorithmen errechneten Werte nur Hinweise und erlauben keine abschliessende Klassifikation der Varianten. Letztere sollte nur nach intensiver Betrachtung der gesamten ermittelten Daten erfolgen. Wichtig ist, hervorzuheben, dass die Klassifikation einer Variante immer einer fundierten Annahme nach aktuellstem wissenschaftlichem Stand entspricht und es weltweit keine Instanz gibt, die über richtig oder falsch entscheidet.

Das Verfassen eines Befundes, der die Ergebnisse eines HBOC-Panels wiedergibt, erfordert genaue Kenntnisse der Richtlinien für molekulargenetische Befunde, sowie der gesetzlichen Vorgaben

für genetische Untersuchungen am Menschen. Der Befund umfasst alle vom Auftraggeber bereitgestellten Daten zur Klinik, Familienanamnese und der daraus resultierenden Fragestellung sowie die auffälligen, mittels NGS identifizierten Varianten, die Begründung derer Klassifikation und alle technischen Angaben zur Durchführung der Laboranalyse. Benigne oder wahrscheinlich benigne Varianten werden aufgrund derer Harmlosigkeit und häufigen Vorkommnisse nicht im Bericht des Labors erfasst. VUS, wahrscheinlich pathogene und pathogene Varianten hingegen sind jedoch zwingender Bestandteil. Der Befund soll helfen, den Patienten bestmöglich zu beraten und allfällige weitere Schritte zu planen. Somit enthält der Laborbefund auch Empfehlungen zur Testung möglicher weiterer Blutsverwandten und falls gewünscht auch das Risiko für die Nachkommen des Patienten. Nachfolgend zwei Befund-Beispiele, sowie das Auftragsformular.

¹ Krebsliga Schweiz; Krebs in der Schweiz: wichtige Zahlen, <https://www.krebsliga.ch/ueber-krebs/zahlen-fakten/>, Zugang: Oktober 2021

² American Cancer Society; <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about.html>, Zugang: Oktober 2021

³ Ovarian Cancer Research Alliance; <https://ocrhope.org/patients/about-ovarian-cancer/>, Zugang: Oktober 2021

⁴ Krebsliga Schweiz; <https://shop.krebsliga.ch/files/kls/webshop/PDFs/deutsch/erblich-bedingter-brust-und-eierstockkrebs-011004011111.pdf>

⁵ Petrucelli, Nancie, Mary B. Daly, and Tuya Pal. "BRCA1-and BRCA2-associated hereditary breast and ovarian cancer." *GeneReviews* [Internet] (2016) [Updated 2016 Dec 15]

⁶ https://www2.tri-kobe.org/nccn/guideline/gynecological/english/genetic_familial.pdf

⁷ Richards, Sue, et al. "Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology." *Genetics in medicine* 17.5 (2015): 405-423

⁸ Mersch, Jacqueline, et al. "Prevalence of variant reclassification following hereditary cancer genetic testing." *Jama* 320.12 (2018): 1266-1274

Eingang: XX.XX.XXXX
Ausgang: XX.XX.XXXX
Material: EDTA-Blut

Patient/in: **Muster Maria (F)**
geb. 10.10.1960
Musterstrasse 10
1234 Musterhausen

Einsender/in: Herr Dr. med. M. Müller
Müllerstrasse 20
8000 Zürich

Fragestellung/Anamnese/Indikation:

- Patientin mit triple-positivem Mamma-Karzinom (60-jährig)
- Schwester Mamma-Karzinom mit 50 Jahren
- Grossvater (ms) Prostata-Karzinom mit 60 Jahren

Gewünschte Untersuchung:

Genanalyse mittels Next Generation Sequencing

Untersuchte Gene: *BRCA1* (LRG_292_t1), *BRCA2* (LRG_293_t1), *ATM* (LRG_135_t1), *BARD1* (LRG_297_t1), *BRIP1* (LRG_300_t1), *CDH1* (LRG_301_t1), *CHEK2* (LRG_302_t1), *EPCAM* (LRG_215_t1), *MLH1* (LRG_216_t1), *MSH2* (LRG_218_t1), *MSH6* (LRG_219_t1), *NBN* (LRG_158_t1), *PALB2* (LRG_308_t1), *PMS2* (LRG_161_t1), *PTEN* (LRG_311_t1), *RAD51C* (LRG_314_t1), *RAD51D* (LRG_516_t1), *STK11* (LRG_319_t1), *TP53* (LRG_321_t1)

Kopiennummervarianten (CNV) - Analyse mittels MLPA

Untersuchte Gene: *BRCA1* (LRG_292_t1), *BRCA2* (LRG_293_t1)

Resultat: KEINE pathogene Sequenzvariante nachweisbar

Beurteilung:

Keine pathogenen Sequenzvarianten in den analysierten Genabschnitten nachweisbar.

Das Resultat sollte im Rahmen einer genetischen Beratung mitgeteilt werden.

validiert durch:



Eingang: XX.XX.XXXX
 Ausgang: XX.XX.XXXX
 Material: EDTA-Blut

 Patient/in: **Mustermann Mirjam (F)**
 geb. 15.11.1978
 Musterstrasse 20
 1234 Musterhausen

 Einsender/in: Frau Dr. med. H. Huber
 Huberstrasse 20
 8000 Zürich
Fragestellung/Anamnese/Indikation:

- Patientin mit Mamma-Karzinom mit 42 Jahren
- Zwei Tanten (vs) mit Pankreas-Karzinom mit 35 bzw. 62 Jahren

Gewünschte Untersuchung:**Genanalyse mittels Next Generation Sequencing**

Untersuchte Gene:

BRCA1 (LRG_292_t1), *BRCA2* (LRG_293_t1), *ATM* (LRG_135_t1), *BARD1* (LRG_297_t1), *BRIP1* (LRG_300_t1), *CDH1* (LRG_301_t1), *CHEK2* (LRG_302_t1), *EPCAM* (LRG_215_t1), *MLH1* (LRG_216_t1), *MSH2* (LRG_218_t1), *MSH6* (LRG_219_t1), *NBN* (LRG_158_t1), *PALB2* (LRG_308_t1), *PMS2* (LRG_161_t1), *PTEN* (LRG_311_t1), *RAD51C* (LRG_314_t1), *RAD51D* (LRG_516_t1), *STK11* (LRG_319_t1), *TP53* (LRG_321_t1)

Kopiennummervarianten (CNV) - Analyse mittels MLPAUntersuchte Gene: *BRCA1* (LRG_292_t1), *BRCA2* (LRG_293_t1)**Resultat:****PATHOGENE Sequenzvariante BRCA2: c.6730A>T, p.(Lys2244Ter) nachweisbar****Pathogene Sequenzvariante:**

Gen	Nukleotid	Aminosäure	Frequenz	Auswirkung	Klasse*
<i>BRCA2</i>	c.6730A>T	p.(Lys2244Ter)	Heterozygot 48.1%	Pathogen	5

*Klasse der Genvarianten nach den ACMG Kriterien:

1. Benigne; 2. Wahrscheinlich benigne; 3. Unklare Signifikanz; 4. Wahrscheinlich pathogen; 5. Pathogen.

Beurteilung:Die o.g. pathogene Sequenzvariante wurde heterozygot **nachgewiesen**.

Die Sequenzierung der BRCA2-spezifischen PCR-Produkte zeigt im Exon 11 (von insgesamt 27) die Missense-Punktmutation c.6730A>T. Diese Nukleotidsubstitution ersetzt die Aminosäure Lysin bei Codon 2244 mit einem verfrühten Stopcodon (p.Lys2244ter) und führt somit zu einem trunkierten Protein durch vorzeitigen Kettenabbruch (LOF, «loss of function»).

Das Resultat sollte im Rahmen einer genetischen Beratung mitgeteilt werden.

validiert durch:

**PATIENTENDATEN**

Name

EINSENDER, AUFTRAGGEBER

→ Anordnung nur durch Fachärzte, keine Selbstzuweisung

Vorname

Strasse

PLZ / Ort

Geb.-Datum

Ethnie

Entnahmedatum**Rechnung an**

-
- Patient
-
-
- Krankenkasse
-
-
- Einsender

Fragestellung / Bemerkungen Kopie an:**Klinische Angaben (Anamnese, Stammbaum, Vorbefunde bitte beilegen)****Tumorgenetik BRCA1 / BRCA2 / HBOC**Material:
EDTA-Blut nur *BRCA1/BRCA2*NGS-Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2*
MLPA-Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2* *BRCA1/2 + HBOC*NGS-Analyse HBOC assoziierter Gene
BRCA1, BRCA2, ATM, BARD1, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, NF1, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53
MLPA-Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2* **fam. Mutation**Bezeichnung:
(bitte Befund von Indexpatient beilegen)