

PREVALENCE ZÁCHYTU CNVs U PACIENTŮ INDIKOVANÝCH K VYŠETŘENÍ HEREDITÁRNÍCH NÁDOROVÝCH SYNDROMŮ

FORGÁČOVÁ L.¹, ELBLOVÁ L.², MALÁ T.², MORÁVKOVÁ P.¹, FARKAŠOVÁ A.¹, ŠENKEŘÍKOVÁ M.², PAVLÍKOVÁ L.¹,
HYŠPLER R.¹, GANČARČÍKOVÁ M.¹



¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové

²Oddělení lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové



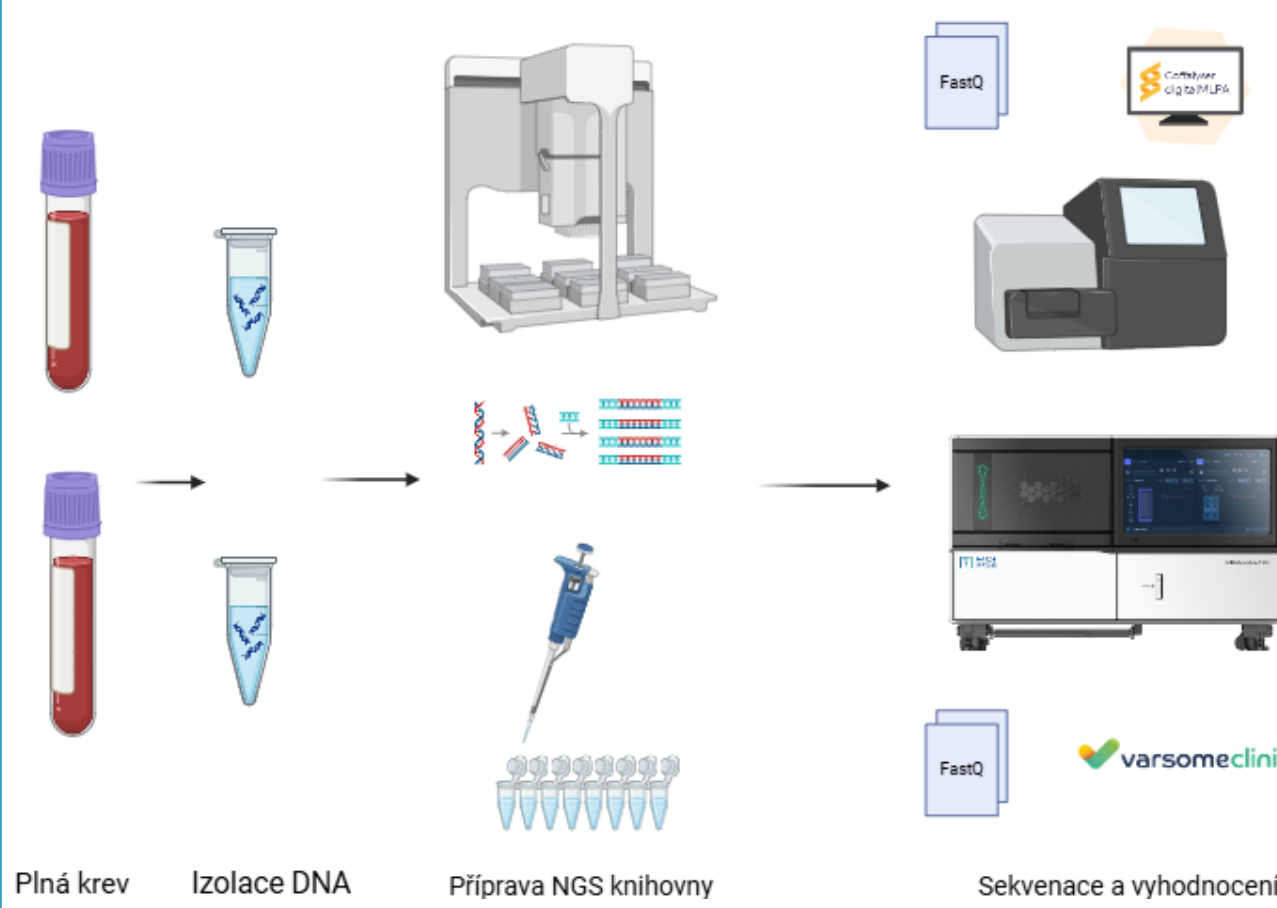
ÚVOD

Hereditární nádorové syndromy představují geneticky heterogenní skupinu onemocnění se zvýšeným rizikem vzniku malignit různého typu. **Molekulárně genetická analýza** pomocí technologie sekvenování nové generace (NGS) umožňuje detekci nejen jednonukleotidových variant, malých insercí a delecí (SNVs), ale i identifikaci rozsáhlých variant (**copy number variants, CNVs**) v rámci jednotlivých exonů či genů. Jejich identifikace je umožněna díky pokročilým bioinformatickým nástrojům a inovativním technikám využívajících NGS, jako je digitální MLPA nebo NGS design rozšířený o specifické exon-proximální próby.

Cílem této práce bylo stanovit prevalenci kauzálních CNVs u pacientů indikovaných k molekulárně genetickému vyšetření hereditárních nádorových syndromů.

METODIKA

Obr 1. Schématické znázornění postupu molekulárně genetické analýzy



Soubor pacientů

Do hodnocení bylo zahrnuto **1210 pacientů** splňujících indikační kritéria ke genetickému vyšetření hereditárních nádorových syndromů v období 01/2023 až 05/2025

Laboratorní postup (Obr.1)

- Izolace DNA z periferní krve (QIAamp Blood Mini Kit, Qiagen)
- Příprava NGS knihoven metodou masivně paralelního sekvenování (MPS) pomocí target enrichment (SureSelectXT HS, Agilent)
- Sekvenace na platformách DNBSEQ-G400 (MGI) a MiSeq System (Illumina)

Analýza CNVs

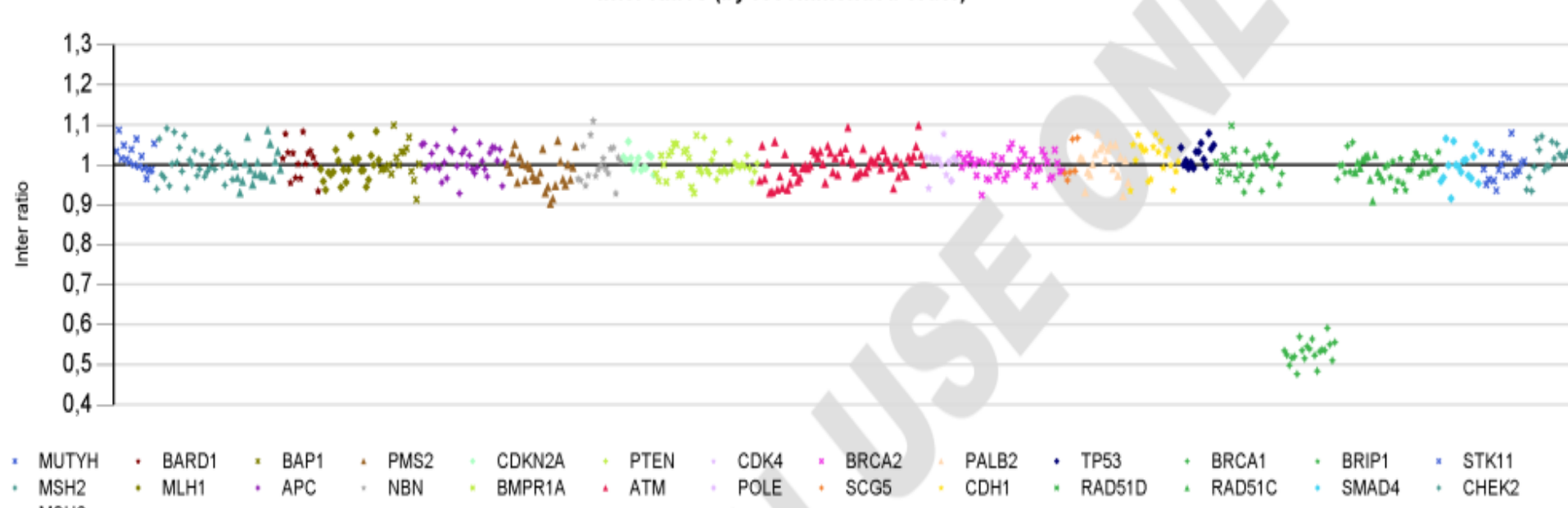
- Do 06/2024 prováděna **digitální MLPA** (MRC Holland)
- Od 06/2024 využíván **NGS design rozšířený o exon-proximální próby**

- Sekundární a terciární analýza: Do 06/2024 Coffalyser digitalMLPA (MRC Holland), od 06/2024 Varsome Clinical (Saphetor)
- Reference Human Genom GRCh38.p14/hg38, varianty jsou hodnoceny dle klasifikace variant ACMG/AMP (American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology)

Obr 2. Příklad výstupu z digitální MLPA

ID 7 – BRCA1 del ex 5-14, het

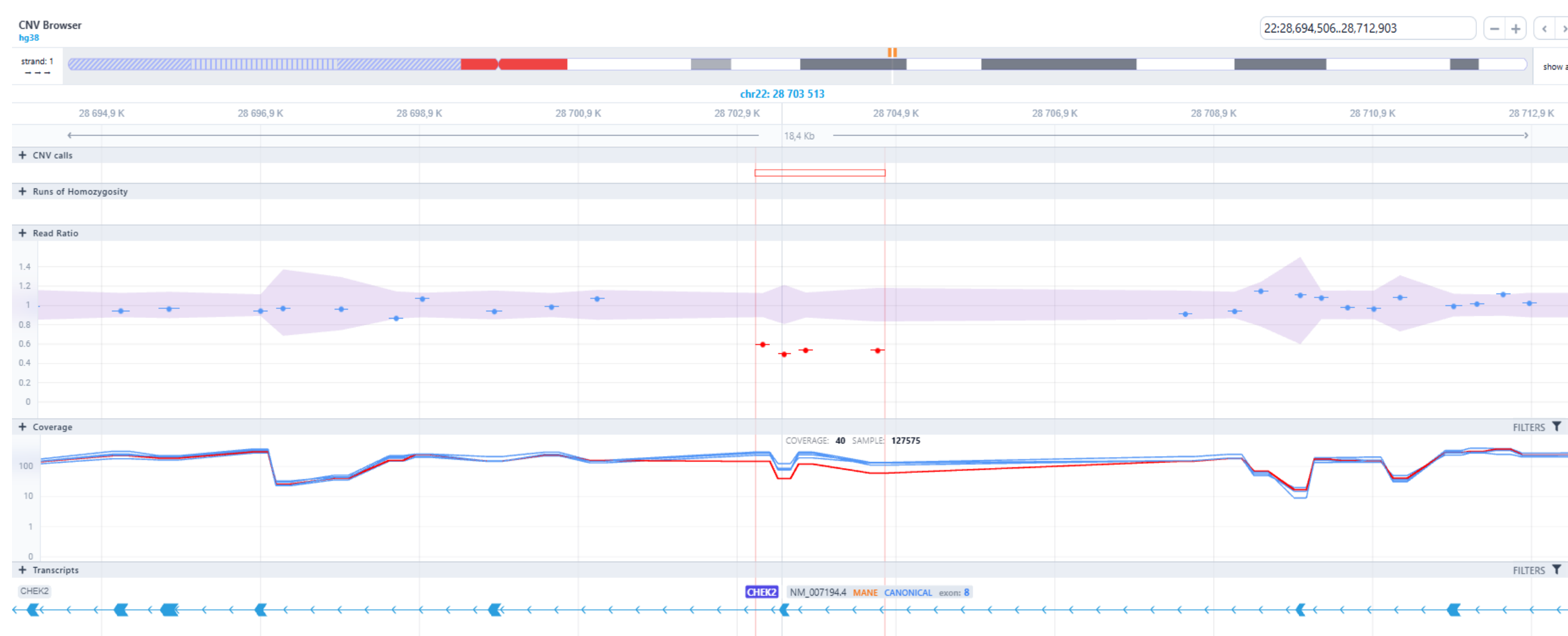
Inter ratios (by recommended order)



Gen	Ratio	Call	Interpretation	Pathogenicity
BRCA1	0.48	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.52	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.52	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.52	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.48	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.57	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.54	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.52	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.55	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.55	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.54	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.56	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.52	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.48	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.53	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.54	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.54	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.59	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.55	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.51	TooLow	Decreased238Del	False
BRCA1	0.56	TooLow	Decreased238Del	False

Obr 3. Příklad výstupu analýzy CNV, Varsome Clinical

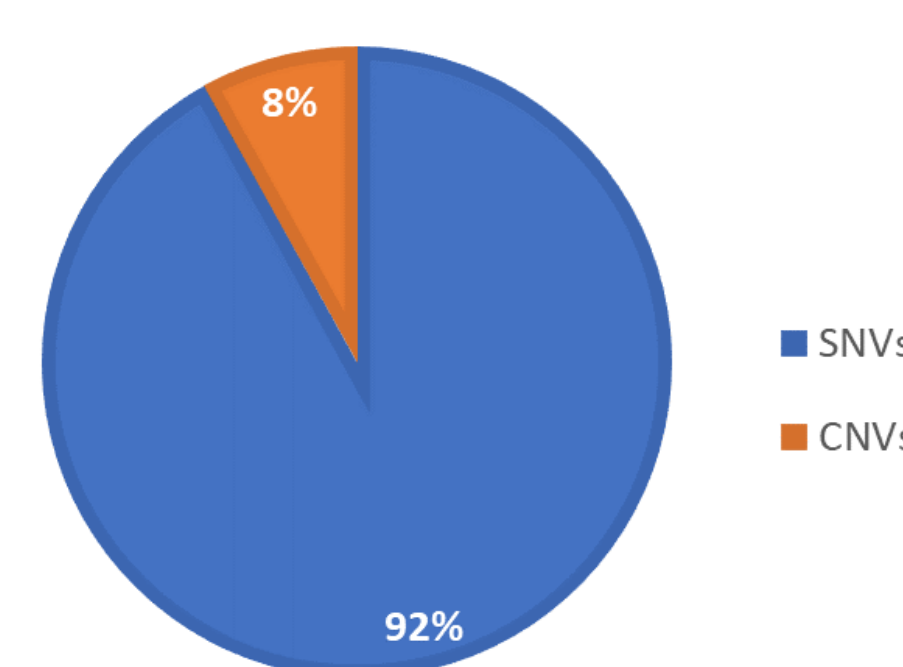
ID 9 – CHEK2 del ex 8, het



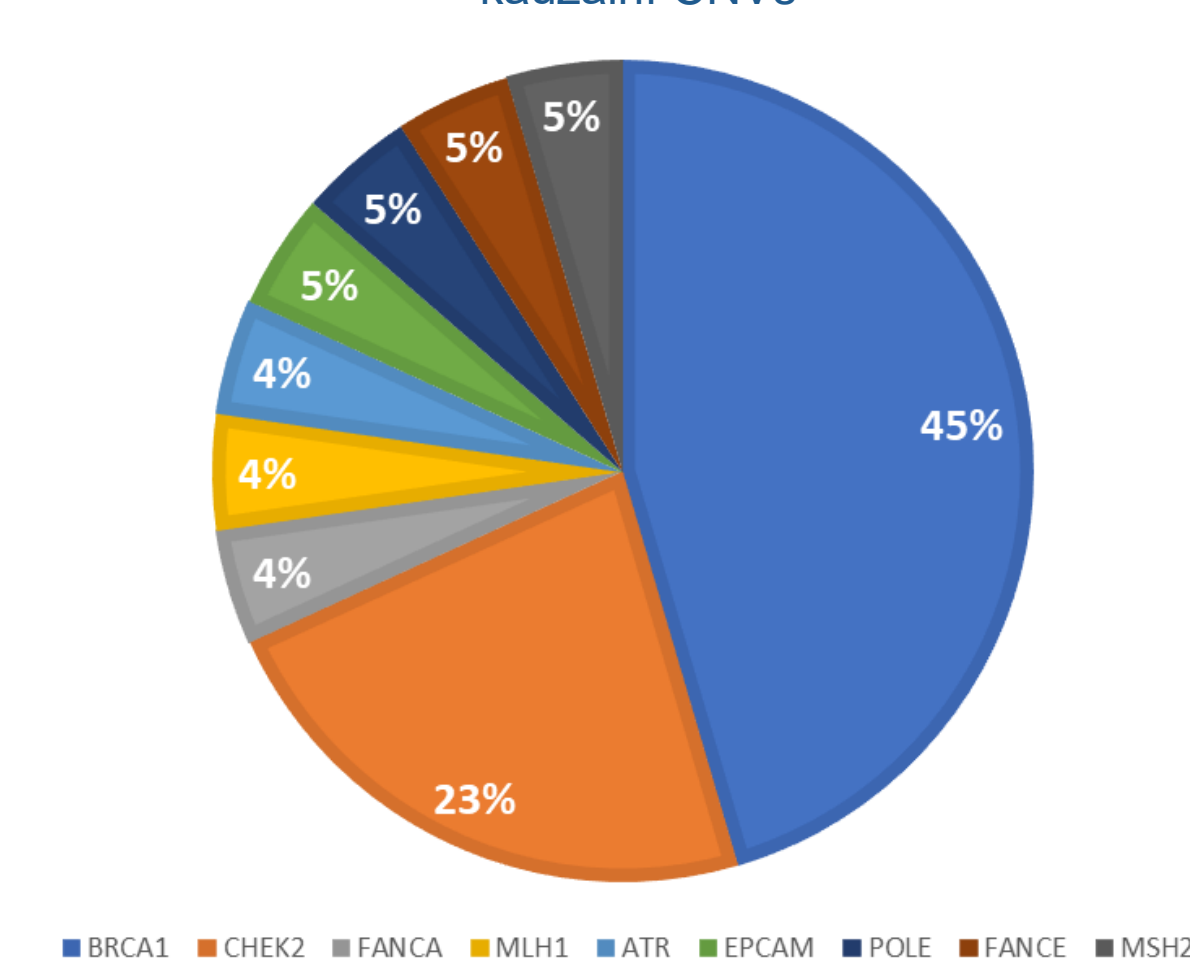
VÝSLEDKY

- Patogenní (P) nebo pravděpodobně patogenní (LP) varianty (třídy 4-5) byly nalezeny u 276 vyšetřovaných jedinců (**22,8 %**), z toho u **22 pacientů (8 %)** šlo o CNVs (Graf 1). Kauzální CNV byla tedy detekována **celkem u 1,8 % jedinců** indikovaných k molekulárně genetické analýze (22/1210).
- Ve srovnání se studií z roku 2023 (1), kde byla prevalence P/LP variant z celkového souboru pacientů 21,5 % (464/2163), z čehož CNVs tvořily 10,8 % všech pozitivních nálezů (50/464), jsou naše výsledky **srovnatelné z hlediska celkového záchytu i podílu CNVs**.

Graf 1. Zastoupení SNVs a CNVs mezi pozitivními nálezy (n=276)



Graf 2. Spektrum genů v nichž byly detekovány kauzální CNVs



- Téměř polovinu detekovaných CNVs přestavovaly **delece v genu BRCA1** (10 případů), následované **delecemi v genu CHEK2** (5 případů) (Graf 2).
- V Tabulce 1 jsou uvedeny jednotlivé záchyty CNVs třídy 4-5 ve vyšetřovaném souboru. Nejčastější detekovanou CNV u genu **BRCA1** byla **rekurentní delece zahrnující exony 5-14**, v genu **CHEK2** delece exonů 9-10. Detekována byla také 1 duplikace v genu **MSH2**.

Tab 1. Detekované CNVs třídy 4-5 (Příklady Obr. 2, 3 a 4).

ID	Typ karcinomu*	Gen	CNV	Exons	Velikost (kb)**	ID	Typ karcinomu*	Gen	CNV	Exons	Velikost (kb)**
1	Ca prsu	BRCA1	del	5-14	32,0	12	Ca střeva	MSH2	dup	3-6	6,4
2	Ca pankreatu	BRCA1	del	5-14	32,0	13	Ca prsu	EPCAM	del	1	4,1
3	Ca prsu	BRCA1	del	5-14	32,0	14	Ca prsu	BRCA1	del	17-18	7,0
4	Ca prsu	FANCA	del	1-7	11,4	15	Ca prsu	POLE	del	1-16	16,1
5	Ca prsu	CHEK2	del	8	1,6	16	Ca střeva	FANCA	del	2-9	7,3
6	Ca ovária	BRCA1	del	18-22	14,9	17	Ca prsu	BRCA1	del	5-14	30,4
7	RA	BRCA1	del	5-14	30,4	18	RA	BRCA1	del	5-14	30,4
8	Ca mizních uzlin	BRCA1	del	up1-2	2,5	19	RA	BRCA1	del	5-14	30,1
9	Ca prsu	CHEK2	del	8	1,6	20	Ca prsu	CHEK2	del	9-10	4,4
10	Ca střeva	MLH1	del	6	0,2	21	Ca štít. žlázy	CHEK2	del	9-10	4,4
11	RA	ATR	del	1-47 (celý gen)	130,0	22	Ca prsu	CHEK2	del	9-10	4,4

* RA - Zhoubný novotvar v rodinné anamnéze

**Velikost dána custom designem

- Souběžným nálezem jak patogenní jednonukleotidové varianty, tak patogenní CNV, byla detekce delece exonů 9-10 v genu **CHEK2** společně s patogenní missense variantou c.1103G>A (p.Gly368Asp) v genu **MUTYH** u dvou nepříbuzných pacientů s odlišnou indikací a diagnózou (ID 20 a 21).
- Od 06/2024 je využíván NGS design rozšířený o **exon-proximální próby**, které zpřesňují analýzu CNVs v rámci samotného procesu MPS bez nutnosti provedení MLPA/digitální MLPA. Tento přístup může například také pomoci řešit situace, kdy není dostupný konkrétní MLPA probemix pro vybraný gen či skupinu genů.

Obr 4. Příklad výstupu analýzy CNV, Varsome Clinical

ID 8 – BRCA1 del ex up1-2, het



ZÁVĚR

Kauzální CNVs představovaly 8 % z celkového počtu pozitivních záchytů ve vyšetřovaném souboru pacientů. Jejich detekce je nedílnou součástí molekulárně genetického vyšetření pacientů s hereditárními nádorovými syndromy a významně přispívá k záchytu kauzálních variant a objasnění etiopatogeneze onemocnění. Systém exon-proximálních prób pro analýzu CNVs, začleněný do panelového designu, zvyšuje efektivitu vyšetření v rutinní genetické diagnostice.