

## Panel Diagnostik für das Hereditäre Brust- und/oder Ovarialkarzinom (HBOC NGS V9) auf wissenschaftlicher Basis

### Kontaktinformationen

#### Klinische Fragestellungen, Einschlusskriterien

Dr. med. Hoa Huu Phuc Nguyen  
Tel: 07071 29 83210  
Fax: 07071 29 5171  
Email: hoa.nguyen@med.uni-tuebingen.de

#### Labor

Dr. rer. nat. Ulrike Faust  
Tel: 07071 29 72307  
Fax: 07071 29 25065  
Email: ulrike.faust@med.uni-tuebingen.de

### Kurzbeschreibung

Bei Patienten mit Hinweisen auf ein hereditäres Brust- und/oder Ovarialkarzinom (HBOC) kann zum aktuellen Zeitpunkt mittels Sanger-Sequenzierung von *BRCA1* und *BRCA2* in 7-50% der Fälle (je nach Familienkonstellation) die Diagnose molekulargenetisch gesichert werden. Um die diagnostische Ausbeute zu verbessern, haben wir basierend auf dem Stand aktueller Sequenzieretechnik eine 79-Gene umfassende Analyse etabliert und validiert. Hierfür erfolgt eine spezifische Anreicherung (Agilent HaloPlex) und Sequenzierung mit Next-Generation-Sequencing (Illumina MiSeq 2x 150 bp paired-end).

Das **Core-Panel** umfasst **11 Gene** deren Varianten (VUS3-5) in einem abschließenden Befund bzw. Bericht aufgeführt werden. Zu diesem Core-Panel zählen die klassischen hochpenetranten Gene wie *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C* und *RAD51D*, die auch bisher Teil der Routinediagnostik sind, aber auch weitere mit HBOC-assoziierte Gene wie *TP53*, *PTEN*, *STK11* und *CDH1* und moderat penetrante Gene wie *CHEK2*, *PALB2* und *ATM*. Veränderungen in diesen Core-Genen können von direkter Bedeutung hinsichtlich Planung von Vorsorgeuntersuchungen oder therapeutischem Vorgehen bzw. Untersuchungen in der weiteren Familie sein.

Der betreuende Arzt entscheidet, welche Gene in der jeweiligen Situation von besonderem Interesse sind. Nur diese werden dann lückenlos und mit Deletions- bzw. Duplikationsscreening (MLPA) untersucht und befundet. Veränderungen in den verbleibenden Core-Genen werden in einem wissenschaftlichen Bericht aufgeführt, in welchem auch die für diese Gene nicht-ausreichend analysierten Teilbereiche („Analyselücken“) basengenau aufgeführt werden. Die restlichen Gene des Panels werden ausschließlich für wissenschaftliche Analysen herangezogen.

### Einschlusskriterien / erforderliche Unterlagen

- Familiäre Tumorneigung (wie auch sonst in den Leitlinien festgelegt; z.B. mehrere Familienmitglieder mit Brust- und/oder Eierstockkrebs, besonders junges Erkrankungsalter, beidseitig erkrankte Frauen, männliche Brustkrebserkrankung in der Familie)
- Prädiktive Analysen dürfen nur durch Fachärzte für Humangenetik sowie Ärzte mit entsprechender Zusatzausbildung veranlasst werden
- Relevante klinisch-genetische Angaben (z.B. Kopie des genetischen, gynäkologischen und pathologischen Gutachtens)
- DNA (Blut)-Proben des Patienten (mindestens 5 µg DNA bzw. 5 ml EDTA-Blut)
- GenDG konformes schriftliches Einverständnis
- Überweisungsschein Muster 10 mit dem Auftrag „Paneldiagnostik hereditäres Brust- und Ovarialkarzinom“

- Privat versicherte Patienten benötigen keinen Überweisungsschein. Vor der Durchführung einer molekulargenetischen Diagnostik sollte aber die Kostenübernahme durch die private Krankenkasse geklärt werden. Dazu erstellt das *Institut für Humangenetik und Angewandte Genomik* jederzeit gern einen Kostenvoranschlag.

## **Analysedauer / Technischer Ablauf / Datenspeicherung / Resultate**

**Analysedauer:** Sobald die Analyse im Labor begonnen werden kann (wenn der Auftrag vollständig vorliegt), benötigen wir etwa 4 Wochen für die Sequenzierung, 4 Wochen für die Datenanalyse und ggf. weitere 4-8 Wochen für Validierungssequenzierungen. Insgesamt dauert die Analyse also 3-4 Monate.

**Technischer Ablauf:** Die Sequenzierung umfasst die (1) Fragmentierung der DNA durch multiple Restriktionsenzym-Verdaus, (2) die Zirkularisierung spezifischer DNA-Spaltprodukte durch Selector-Probe Sonden und anschließendes Ligieren zu ringförmiger DNA, (3) die PCR-Amplifikation zirkulärer DNA mit patientenspezifischen Barcodes (MIDs), (4) Qualitätskontrolle und Quantifizierung der DNA-Bibliothek, (5) paired-end Sequenzierung der DNA-Bibliothek durch Illumina MiSeq Technologie (mindestens 2x 150 bp).

Die bioinformatische Analyse der Sequenzierdaten geschieht durch folgende Schritte:

- Mapping der Reads auf das hg19 Referenzgenom (Stampy)
- Detektion von Varianten: SNPs, SNVs, kurze Deletionen und Insertionen (SAMtools)
- Annotation der Varianten mit Daten u.a. aus den Datenbanken dbSNP und 1000 Genomes (Annovar).

Neben der Suche nach kleinen intra-exonischen Deletionen wird mittels einer statistischen Analyse nach Deletionen von kompletten Exons gesucht. Letztere Analyse ist derzeit noch nicht diagnostisch validiert.

**Resultate:** Mit Abschluss der Analysen wird ein schriftlicher Befund für die selektiv beauftragten Gene erstellt. Pathogene Mutationen sowie unklassifizierte Varianten werden mitgeteilt und hinsichtlich ihrer möglichen Pathogenität gewertet. Veränderungen (VUS3-5) in den weiteren Genen des Core-Panels werden in einem Bericht mitgeteilt, in welchem nicht-ausreichend analysierte Teilbereiche („Analyselücken“) exakt benannt werden. In einigen Fällen wird es für die Beurteilung der Krankheitsrelevanz von Varianten notwendig sein, Angehörige in die Untersuchung einzubeziehen (Ko-Segregations-Analysen). Veränderungen in den weiteren Genen werden auf wissenschaftlicher Basis ausgewertet.

### **Limitationen:**

- Potentielle Splice-Site Mutationen werden nur innerhalb der hochkonservierten Konsensus-Bereiche (+/- 4 Basen vom Exon-Intron-Übergang) analysiert.
- Große Deletionen oder Duplikationen werden nicht erkannt (Ausnahme: werden für die selektiv angeforderten Core-Genes mittels MLPA analysiert).

## **Genliste (Core-Gene fett gedruckt)**

*AKT1, APC, **ATM**, ATR, BABAM1, BAP1, BARD1, BLM, BMPR1A, **BRCA1**, **BRCA2**, BRCC3, BRIP1, **CDH1**, CDK4, CDKN2A, CHEK1, **CHEK2**, CNTLN, CTNNA1, EPCAM, ERCC2, FAM175A/*Abraxas*, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCM, FANCP/*SLX4*, GEN1, KANK4, MAP3K6, MEN1, MITF, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH3, MSH6, MUTYH, NBN, NEIL1, NF1, NOTCH2, NTHL1, OBSL1, **PALB2**, PBRM1, PCSK7, PIK3CA, PMS1, PMS2, PPM1D, POT1, PRSS1, PTCH1, **PTEN**, RAD50, RAD51, RAD51B, **RAD51C**, **RAD51D**, RBBP8, RECQL, RET, SBDS, SMAD4, SMARCA4, SMO, **STK11**, SUFU, TIPARP, **TP53**, TP53BP1, UIMC1, XRCC2, XRCC3*

## **Referenzen**

Literatur-Stellen sind auf unserer Homepage referiert ([www.medgen-tuebingen.de](http://www.medgen-tuebingen.de)).