

**A *BRCA1* és *BRCA2* gének
tumorevolúcióban szerepet játszó
mutációinak vizsgálata**

Ph.D. értekezés

Enyedi Márton Zsolt

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

2017. Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETŐ	6
2.1. A tumorevolúció molekuláris genetikai alapja	6
2.2. A <i>BRCA</i> tumorszuppresszor gének általános jellemzői	7
2.3. A <i>BRCA</i> fehérjék és sejtben betöltött szerepei	8
2.4. A <i>BRCA</i> génekhez köthető emlő- és petefészek-daganatok	11
2.5. <i>BRCA</i> gének által irányított tumorevolúció	13
2.6. <i>BRCA</i> mutációk	16
2.7. A HBOC rizikócsoporthoz tartozók diagnosztikai és terápiás lehetőségei	18
2.8. A <i>BRCA</i> mutációk azonosítására használt diagnosztikai módszerek	20
3. CÉLKITŰZÉSEK	23
4. ANYAG ÉS MÓDSZEREK	25
4.1. Betegminták és DNS	25
4.2. Multiplex PCR alapú target amplifikálás	27
4.3. Fragmentkönyvtár-készítés és újgenerációs szekvenálás	28
4.4. Bioinformatikai adatelemzés	32
4.5. Nagy genomi átrendeződések kimutatása	35
4.6. Formalinnal fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) tumorminták vizsgálata	37
4.7. A mutáció-analízis érzékenységeinek vizsgálata	37
5. EREDMÉNYEK	39
5.1. A <i>BRCA</i> mutációk azonosítására kifejlesztett diagnosztikai módszer tesztelése	39
5.2. A <i>BRCA</i> mutációk azonosítására kifejlesztett diagnosztikai módszer validálása	43
5.2.1. Mutáció-analízis Illumina MiSeq szekvenálás esetén	44
5.2.2. Mutáció-analízis Ion Torrent szekvenálás esetén	45
5.3. Nagy genomi átrendeződések kimutatása	47
5.4. <i>BRCA</i> tumorevolúció vizsgálata tumormintákon	48
5.5. A mutáció-analízis érzékenységeinek vizsgálata	53
6. DISZKUSSZIÓ	54
7. IRODALOMJEGYZÉK	62
8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	74
9. ÖSSZEFOGLALÁS	75
10. SUMMARY	80

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	85
12. FÜGGELÉK.....	86

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BAM – Binary Alignment/Map format

BER – Base Excision Repair

COSMIC – Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer

DQ – Dosage Quotient

EMA – European Medical Agency

ES – Enrichment System

FFPE – Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

FN – Fals Negatív

FP – Fals Pozitív

HBOCS – Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome

HGVS - Human Genom Variation Society

HR – Homológ Rekombináció

HRM – High Resolution Melting

Indel – Inszerció és/vagy delécio

IPS – Ion Sphere Particle

LGR – Large genomic rearrangement

LOH – Loss Of Heterozygosity

MAQ – Multiplex Amplicon Quantification

NGS – Next-Generation Sequencing

OT – One Touch

PARPi – Poli(ADP-Ribose) Polymerase inhibitor

PTT – Protein Truncation Test

QMPSF – Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

SNV – Single Nucleotide Variant

SSBR – Single-strand break repair

SSCP – Single Strand Conformation Polimorphism

UTR – UnTranslated Region

VAF – Variant Allele Frequency

VN – Valós Negatív

VP – Valós Pozitív

VCF – Variant Call Format

VUS – Variant of Unknown Significance

2. BEVEZETŐ

2.1. A tumorevolúció molekuláris genetikai alapja

A daganatos megbetegedések a fejlett országokban a vezető halálokok között szerepelnek [1]. Előrejelzések szerint, 2050-re minden második időszerű ember valamilyen daganatos betegségben fog szenvedni [2]. Az már régóta ismert, hogy a rák genetikai betegség, és hogy a sejtek rákos elburjánzásáért elsősorban a genetikai állományban végbemenő változások, mutációk és nagy genomi átrendeződések a felelősek [3]. Ezek a genetikai változások az esetek 5-10%-ban örökletes mutációkra vezethetők vissza, döntő többségében viszont az ember élete folyamán létrejövő genetikai módosulásokról van szó [4]. A karcinogenezis folyamatát gyakran hasonlítják a darwini evolúcióhoz, amelynek során a sejt a DNS-ben bekövetkező mutációknak köszönhetően szelekciós előnyökre tesz szert [5]. Egy adott mikrokozonyzetben ezek a szelekciós előnyök lehetővé teszik a sejt számára a klonális elszaporodást. Az osztódás felgyorsulása kedvez az újabb mutációk megjelenésének, amelyek újabb szelekciós előnyt biztosíthatnak az érintett sejteknek a térben vagy időben megváltozott mikrokozonyzetben [6]. Ugyanakkor a közelmúltban olyan tanulmányok is megjelentek, amelyek azt sugallják, hogy bizonyos daganatok esetében a genetikai változások (elsősorban kópiaszám-eltérések) nem szekvenciálisan jelennek meg a tumorfejlődés folyamán, hanem sokkal inkább egymással párhuzamosan alakulnak ki a tumorigenezis egy korai szakaszában [7]. Azokat a genetikai változásokat, amelyek ténylegesen hozzájárulnak a daganat kialakulásához és fejlődéséhez, driver mutációknak, az érintett géneket pedig driver géneknek nevezzük. Daganatonként általában 2-8 driver gént/mutációt különböztetünk meg. A többi, rendszerint jóval nagyobb számban jelen lévő mutáció nem nyújt szelekciós előnyt a daganat számára, ezért ezeket járulékos

(„passenger”) mutációknak nevezzük. Az átfogó tumorgenom-szekvenálási programok során eddig 125 driver gént azonosítottak, amelyből 71 tumorszuppresszor, 54 pedig onkogén. A tumorszuppresszorokban az inaktiváló mutációk, míg az onkogénekben az aktiváló mutációk biztosítanak szelektív előnyöket a sejtek számára a tumorigenezis során [8]. A driver génekben lévő mutációk azonosítása kulcsfontosságú a modern, személyre szabott tumorterápia korszakában, különös tekintettel azoknak a géneknek a mutációira, amelyekre már klinikai alkalmazásban/tesztelésben vannak célzott daganatterápiás gyógyszerek. A *BRCA1* és *BRCA2* tumorszuppresszorok az emlő- és petefészek-daganatok legfontosabb driver génjei közé tartoznak, bennük kialakuló inaktiváló mutációk pedig fontos lépését képezik a tumorevolúció folyamatának több daganattípus esetén is.

2.2. A *BRCA* tumorszuppresszor gének általános jellemzői

A *BRCA1* gént Mary-Clair King és kutatócsoportja azonosította elsőként [9]. A 17. kromoszóma hosszú karján (17q21) elhelyezkedő gén 5592 kódoló nukleotidból, illetve 23 exonból áll, amelyek egy 1863 aminosavból álló fehérjét kódolnak. Négyes számú exon nincsen, így a számozás eggyel eltolódik, és a 23. exon a 24-es számot viseli. A *BRCA2* gént Wooster és munkatársai a 13. kromoszóma hosszú karján (13q12-13) lokalizálták [10]. A *BRCA2* gén 27 exonból épül fel, 11 385 kódoló nukleotidból áll, amelyek egy 3418 aminosavból álló fehérje képződését irányítják. Az első exon mindkét gén esetében nem-transzlálódó (untranslated vagy UTR) szekvencia, a 11-es exon pedig szokatlanul nagyméretű (3 - 5 kb).

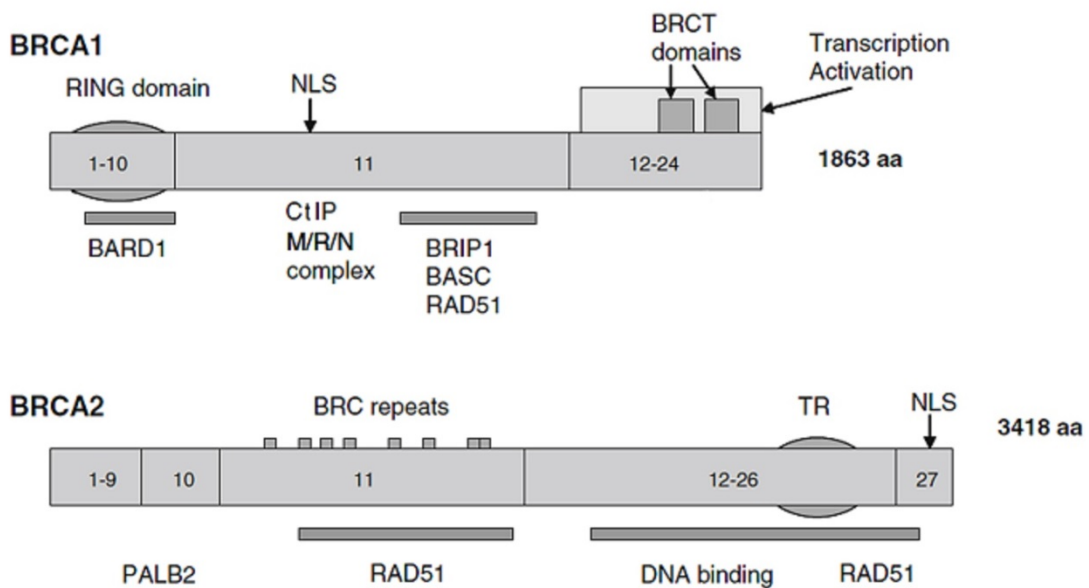
2.3. A BRCA fehérjék és sejtben betöltött szerepei

Úgy a *BRCA1*, mint a *BRCA2* gént a fiatal korban kialakuló emlődaganatra való hajlammal összefüggésben sikerült először azonosítani, nevüket is innen kapták (BRCA: BReast CAncer). Minthogy sok emlő- és/vagy petefészekrákban szenvedő nő esetében igazolódott a *BRCA* gének hibája, már akkor világossá vált, hogy daganatgátló génekről (tumorszuppresszorok) van szó [11]. Ez azzal magyarázható, hogy a *BRCA* gének által kódolt fehérjéknek kulcsszerepe van a genomstabilitás megőrzésében [12,13], következésképpen azok a sejtek, melyekben hibás *BRCA1* vagy *BRCA2* fehérje található, nagyfokú genom instabilitást mutatnak [14–16].

A *BRCA1* és *BRCA2* a genom integritásának megőrzését több aktivitásuk révén is biztosítják. Ezek közül a legfontosabb, hogy a Rad51-gyel kölcsönhatásban részt vesznek a homológ rekombinációban (HR), mely S-fázisú sejtekben a kettősszálú DNS-törések hibamentes kijavításának legfontosabb útvonala [17]. Abban az esetben, ha a *BRCA1* vagy a *BRCA2* fehérje hiányzik, vagy nem működik megfelelően, akkor a HR működése is zavart szenved. HR hiányában a kettősszálú törések javítása alternatív útvonalakon történik, mint a nem-homológ végek összeillesztése (NHEJ: non homolog end joining). Ez további hibákat generál, amelyek kromoszóma-átrendeződésekhez és genom instabilitáshoz vezethetnek [18]. Ezért a *BRCA* hiányos sejtek nagyon érzékenyek kettősszálú törést okozó DNS-keresztelő ágensekre (pl. mitomycin-c, ciszplatin) és ionizáló sugárzásra is [19,20].

A *BRCA1* és *BRCA2* fehérjék szerkezete lényegesen különbözik egymástól. A *BRCA1* tartalmaz egy erősen konzervált amino-terminális RING domént, amelynek E3 ubikvitin ligáz aktivitása van [21]. A fehérje karboxi-terminális végén két BRCT motívum található, amelyeknek foszfo-proteinek megkötésében van szerepük, a DNS-kötő motívummal fuzionálva pedig aktiválják a transzkripciót [22] (1. Ábra). A *BRCA1*

heterodimerként fordul elő a sejtekben egy másik RING/BRCT motívummal rendelkező fehérjével, a BARD1-gyel együtt. BARD1 hiányában a BRCA1 instabil és gyorsan degradálódik [23]. A BRCA1 ubikvitinálja a CtIP fehérjét (CtBP-interacting protein), amely az MRN komplexszel (MRE11, RAD50, NBS1) együttműködve befolyásolja a kettősszálú DNS törések javításának lehetséges útvonalát: a CtIP mediálta szál-visszafertés a kettősszálú törés helyszínén a HR-t stimulálja, míg a NHEJ-ot gátolja [24]. A BRCA1 a BARD1-el közösen részt vesz a proteozómális degradációra jelölt fehérjék ubikvitinációjában is [25]. A RING doménban bekövetkező mutációk a BRCA1 E3 ligáz funkcióját inaktiválják, amely a fehérje egyéb tumorszuppresszor funkcióit is befolyásolja [26].



1. Ábra. A BRCA1 és BRCA2 fehérjék funkcionális doménjeinek és kiemelt interakciós partnereinek sematikus ábrázolása. NLS=Nukleáris lokalizációs szignál (van der Groep és mtsai [27] nyomán).

A BRCA1 nemcsak a kettősszálú DNS-törések kijavításában, hanem a báziskivágó hibajavításban (BER) is szerepet játszik. A BRCA1 hibája azt

eredményezheti, hogy a transzkripcióval kapcsolatos hibajavítás során a hibás nukleotidok nem javítódnak ki, ez pedig a szomatikus mutációk (például G>C transzverziók) gyakoriságának megnövekedéséhez vezethet, ami a *BRCA1* mutációt hordozó betegekben gyakran észlelhető jelenség [28]. A *BRCA1* másik jelentős feladata a sejtciklusellenőrző-pontok megfelelő működésének biztosítása [29,30]. A *BRCA1*-*BARD1* komplex elsősorban a G1/S ellenőrzőpont aktiválásában játszik szerepet, míg a *BRCA1*-*BRIP1*-*TOPBP1* (DNS topoizomeráz 2-kötő fehérje) komplex az S fázisban, a replikációs stressz hatására aktiválódik [31]. A *BRCA1* a *BASC* (*BRCA1*-Associated Genome Surveillance Complex) része. A *BASC* valamennyi tagja képes felismerni a károsodott DNS-struktúrákat, mintegy jelzőrendszerként működve, ugyanakkor szabályozzák a replikációt követő DNS hibajavító mechanizmusokat is [27].

A *BRCA2* fehérje legfontosabb szerepe, hogy a *BRCA1*-hez hasonlóan részt vesz a homológ rekombináció (HR) folyamatában. A *BRCA2* tartalmaz egy nyolc példányban megtalálható BRC motívumot (1. Ábra), amely 20-30 aminosavból áll és a Rad51 megkötésén keresztül a DNS-hibajavításban játszik szerepet [32]. A Rad51 a *BRCA2* TR nevű részével is kölcsönhatásba léphet [33]. Ennek a résznek szabályozó szerepe lehet a rekombináció folyamatában: foszforilációja eredményezhet gátlást és aktiválást is a homológ rekombináció (HR) során [34]. Ezen kívül a *BRCA2* egyes szálú és kettősszálú DNS kötő régiót is tartalmaz. A *BRCA2* a *PALB2* fehérjén keresztül kapcsolódik a *BRCA1*-hez. A három fehérjéből álló komplex kialakulása szükséges ahhoz, hogy a Rad51 a kettősszálú töréshez lokalizáljon. Ezért *BRCA* hiányos sejtekben a Rad51 nem lokalizál a DSB-el, így az nem javítódik HR által. A *BRCA2* fehérje *FANCD1* néven is ismert még. Ez az elnevezés arra utal, hogy szerepet játszik a Fanconi Anémia DNS hibajavító útvonalban, amely a DNS szálak közötti keresztkötések replikáció során történő kijavításáért felel [35]. *BRCA2* mutáns

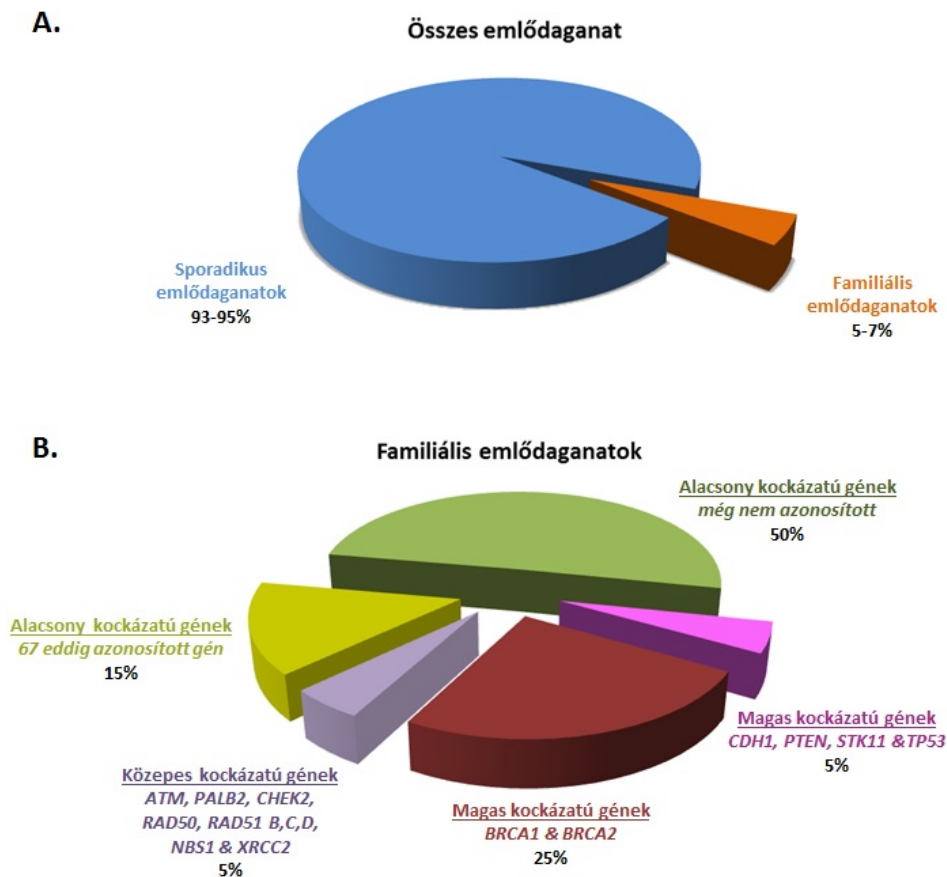
sejtkultúrák kisebb zavart mutatnak a replikációs és sejtciklus ellenőrző folyamatokban, de a BRCA2 nem esszenciális ezekhez a folyamatokhoz [20]. Továbbá feltételezik, hogy a replikációs villán az újonnan szintetizálódó szálát megvédi a degradációtól [36].

2.4. A BRCA génekhez köthető emlő- és petefészek-daganatok

Az emlőrák a nők körében a leggyakoribb daganattípusnak számít, a statisztikai adatok azt mutatják, hogy élete során minden tizedik nőben kialakul ez a betegség [37]. A petefészek-daganat ennél jóval ritkább előfordulású (a nők 1,8-2%-a érintett), ugyanakkor a legrosszabb túlélési eséllyel rendelkező daganattípusok közé tartozik [38]. Az emlő- és petefészek-daganatok döntő többsége sporadikus, azaz nem örökletes, csupán kis részük az, ami öröklött hajlamra vezethető vissza (2. Ábra). Az emlődaganatoknak közel 10%-a, a petefészek-daganatoknak pedig 20-25%-a vezethető vissza örökletes mutációra [39,40]. Ez utóbbit familiális emlő/petefészekrák szindrómának nevezzük (HBOCS: hereditary breast and ovarian cancer syndrome), ami bizonyos génekben hordozott csírvonal-mutációknak köszönhetően alakul ki. A HBOCS-ben érintett, eddig azonosított gének közül a legfontosabb a *BRCA1* és a *BRCA2*, a bennük található mutációk a HBOCS esetek mintegy 20-30%-áért felelősek [41,42]. A *BRCA1* és a *BRCA2* génekben előforduló mutációk 40-85%-kal növelik meg az emlődaganatok, illetve 15-40%-kal a petefészekrák kialakulásnak kockázatát az átlagpopulációra jellemző gyakorisághoz képest [43,44].

A *TP53*, *PTEN*, *STK11* és *CDHI* génekben található örökletes mutációk a *BRCA1-2*-höz hasonlóan magas rákkockázatot jelentenek, előfordulásuk viszont jóval ritkább [45–49]. A DNS-hibajavításban szerepet játszó *PALB2*, *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1*, *RAD50*, *RAD51* stb. gének csírvonal-mutációi közepes rizikójú markereknek

számítanak, 2-3-szoros kockázatnövekedést okozva az emlő- és petefészek-daganatok kialakulására nézve, előfordulási gyakoriságuk viszont ezeknek is csupán néhány százalék [50,51].



2. Ábra. Az emlődaganatok csoportosítása genetikai háttérük alapján. a. Az örökletes genetikai háttérrel rendelkező esetek aránya alacsony. b. A familiális csoporton belül megkülönböztetjük a magas, közepes és alacsony kockázatú gének örökletes mutációit (Melchor és Benítez [52] nyomán).

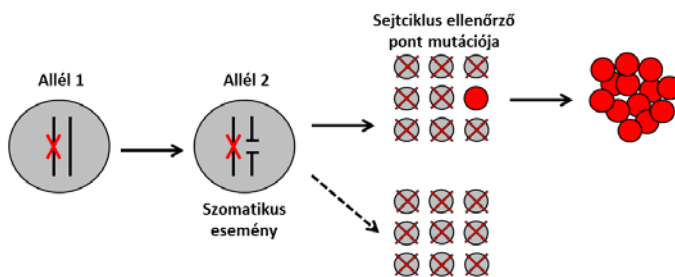
Összességében, az itt felsorolt génekben található mutációk az örökletes mintázatot mutató emlő- és petefészek-daganatok több mint 50%-ában felelősek az örökletes hajlamért, míg az esetek másik felében mindezidáig még nem sikerült azonosítani a megnövekedett kockázatért felelős gént. Az azonban egyértelmű, hogy az emlő- és petefészek-daganatok esetében egyaránt a *BRCA1* és a *BRCA2* a legfontosabb

genetikai markerek, amelyek a legtöbb örökletes esetért felelősek, és mint ilyen, tanulmányozásuk és diagnosztikájuk az alapkutatásban és klinikai gyakorlatban egyaránt kitüntetett figyelmet érdemel.

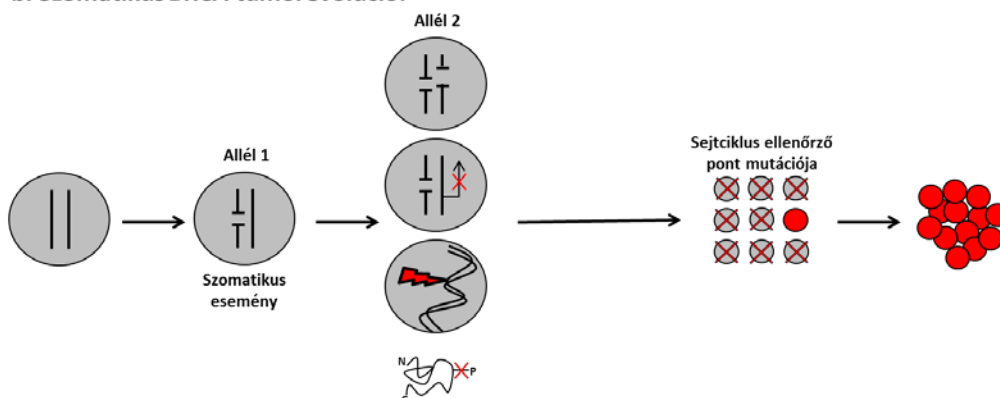
2.5. *BRCA* gének által irányított tumorevolúció

A *BRCA* gének által irányított tumorevolúciónak megkülönböztetjük örökletes és szomatikus változatát aszerint, hogy a *BRCA* fehérje meghibásodása (vagy hiánya) örökletes vagy szomatikus mutáció miatt következik-e be (3. Ábra).

a. *BRCA* tumorevolúció csíravonal mutáció esetén:



b. Szomatikus *BRCA* tumorevolúció:



3. Ábra. *BRCA* gének által irányított tumorevolúció. a. Csíravonal-mutáció esetén a második allél legtöbbször nagy deléciók, genomi átrendeződések révén inaktiválódik. **b.** Szomatikus tumorigenezis esetében mindkét allél sporadikus esemény által inaktiválódik. Ez történhet nagy deléció, promóter-metiláció, pontmutáció vagy a poszttranszlációs módosítások hiánya miatt (Welsh és King [53] nyomán).

Örökletes *BRCA* tumorevolúcióról abban az esetben beszélünk, ha a *BRCA1* vagy a *BRCA2* gének már a csíravonalban olyan mutációt hordoznak, amelynek eredményeként csonka (trunkált), hibás vagy működésképtelen fehérje képződik (3.a. Ábra). Az örökletes mutációk a *BRCA* géneknek általában csak az egyik allélját érintik (heterozigóta), a homozigóta mutációt hordozó egyedek ugyanis az esetek döntő többségében nem életképesek, és az embriógenézis során már korai stádiumban elpusztulnak [54]. Heterozigótaság esetén a másik, vad típusú allélról képződő fehérje normális körülmények között maradéktalanul képes ellátni élettani funkcióit. Viszont a karcinogenezis során a megmaradt vad típusú *BRCA* allél is inaktiválódik, a Knudson két-találat hipotézisének megfelelően [55]. Arra vonatkozóan, hogy ez utóbbi jelenség a *BRCA* gének esetében miért elsősorban az emlő, illetve a petefészek sejteire korlátozódik, jelenleg nem ismert a pontos magyarázat. Az egyik elmélet szerint, a női pubertáskorban, ösztrogén hatására ezekben a szövetekben a sejtek élénk osztódása zajlik replikációs stresszt okozva a sejteknek, ami kedvez a DNS-hibák és genomi átrendeződések kialakulásának, melyek végső soron a vad típusú *BRCA* allél szomatikus inaktiválódásához vezetnek [53]. A *BRCA1-2* génekben az ismétlődő genetikai elemek (Alu, LINE, MER, stb.) nagy aránya kedvez a homológ rekombinációval végbemenő szerkezetbeli módosulások kialakulásának [56], melyek következtében részleges vagy teljes *BRCA1* illetve *BRCA2* lókuszt érintő deléciók jöhetnek létre [57,58]. Ezt a heterozigóta állapot elvesztésének is nevezzük (LOH: loss of heterozygosity), mivel ilyenkor a vad típusú *BRCA* kópia veszik el, ezáltal pedig az addig heterozigóta formában jelenlévő, öröklött *BRCA* kóroki mutáció hemizigótává válik az érintett sejtekben. Következésképpen ezekben a sejtekben nem lesz működőképes *BRCA1* vagy *BRCA2* fehérje, a HR folyamata és a hozzá kapcsolódó egyéb DNS-hibajavítási útvonalak zavart szenvednek. Ez a DNS-hibák felhalmozódásához és a sejtciklus

ellenőrző-útvonalak aktiválódásán keresztül végső soron apoptózishoz vezethetnek. A Welch és King [53] által közölt modell szerint, ha a sejtben felhalmozódó mutációk a sejtciklust ellenőrző fehérjék génjeit is érintik (3. ábra), azok többé nem működnek megfelelően, így egyes BRCA-hiányos sejtek átjuthatnak az ellenőrzőpontokon és a tumorigenezis tovább folytatódhat. A *BRCA* gének által irányított tumorevolúció esetében elsősorban a p53 inaktiválódását tartják szükségesnek a daganat kialakulásához. Újabb vizsgálatok azt mutatják, hogy a vad típusú *BRCA1* vagy *BRCA2* allél elvesztése nem szükségszerűen az első lépése a tumorevolúciónak örökletes emlődaganat esetén. Martins és munkatársainak [59] tanulmánya szerint gyakoribb jelenség az, amikor a *BRCA1* helyett a *TP53* vagy *PTEN* tumorszuppresszor gének inaktiválódnak elsőként. Ezzel az eredménnyel összhangban van az, hogy hasnyálmirigy daganatokban a *BRCA2* LOH szintén a tumorigenezis egy későbbi szakaszában következik be [60].

Az emlő- és petefészek-daganatok bizonyos százalékában megfigyelhető olyan eset is, amikor a *BRCA* gének mindkét allélja szomatikus úton inaktiválódik, ezért ebben az esetben szomatikus *BRCA* tumorevolúcióról beszélünk (3.b. Ábra). A szomatikus mutációk aránya emlő- és petefészek-daganatok esetében egyaránt 4-7% között mozog [61–63]. A promoter-metiláció általi gén inaktiválódás gyakoriságát szintén hasonló nagyságúnak becsülik [64]. A nagy genomai átrendeződések (LGR: large genomic rearrangements) következtében létrejövő LOH azonban már jóval gyakoribb jelenség: az 50-60%-ot is eléri azoknak az eseteknek az aránya, amikor a *BRCA* gének valamelyikének egyik vagy mindkét allélja elveszik a tumorigenezis során [65]. Mindez arra enged következtetni, hogy a *BRCA* géneknek nem csak az örökletes, de a sporadikus emlő- és petefészek-tumorerolúciójában is fontos szerepe van.

2.6. *BRCA* mutációk

Az örökletes emlődaganatos betegek *BRCA* szűréséből származó mutációk legrégebbi és legnagyobb adatbázisa a BIC (Breast Cancer Information Core Database, <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>), amely 1995 óta gyűjti a két gén valamelyikében azonosított eltéréseket, kibővülve az idők folyamán petefészekdaganatos betegek csíravonal-mutációival is [66]. A BIC adatbázis jelenleg közel 3000 különböző *BRCA1-2* génelváltozást tartalmaz, melyek között vannak kóroki (patogén) mutációk, neutrális polimorfizmusok és ismeretlen hatású variánsok is. A patogén mutációk azok az elváltozások, amelyek a daganat kialakulásának kockázatát egyértelműen megnövelik. Ide elsősorban stop-kodont generáló báziscserék (SNP: single nucleotid polimorphism), illetve kereteltolódást okozó inszerciók és deléciók (Indelek) tartoznak, ugyanakkor az aminosavcserével járó mutációk egy része is hibás fehérje képződéséhez vezethet. A semleges hatású polimorfizmusok nem okoznak funkcióváltozást a fehérjében és egyforma gyakorisággal fordulnak elő úgy az átlag, mint a HBOC populációkban. Diagnosztikai szempontból a legnagyobb kihívást az ismeretlen hatású variánsok jelentik (VUS: variant of unknown significance), melyeknek nem ismert a fehérje működésére gyakorolt hatása, illetve *in vitro* kísérletek még nem készültek annak kimutatására, hogy az adott mutáció milyen fenotípus okoz a sejtekben [67]. A *BRCA1* génben jelenleg több mint 500 ilyen ismeretlen hatású variánst tart nyilván a BIC adatbázis [68]. A patogén mutációk a *BRCA1* és a *BRCA2* génben elszórtan bárhol jelentkezhetnek, ugyanakkor megfigyelhetünk viszonylag gyakori, de populációnként változó, ún. alapító mutációkat. A magyar populációban 5 ilyen gyakoribb elváltozást sikerült eddig azonosítani: hármat a *BRCA1*-ben (c.66_67delAG, c.181T>G és c.5263_5264insC), kettőt pedig a *BRCA2*-ben

(c.5946_5946delT és c.9098_9099insA). A magyarországi HBOC betegek esetében a *BRCA1-2* génekben azonosított mutációk 50-60%-át ez az öt elváltozás adja [69,70].

A pontmutációk és kisebb Indelek mellett a *BRCA1-2* gének inaktiválódását egy vagy több exont érintő örökletes deléciók és duplikációk is okozhatják. Ezeknek a gyakorisága populációnként nagyon eltérő, van ahol az örökletes *BRCA1-2* mutációk 50%-át ezek az elváltozások adják, máshol viszont csak pár százalékos az előfordulási arányuk. Elsősorban a *BRCA1*-re jellemzőek, és csak kisebb arányban érintik a *BRCA2* gént [71]. A magyar populációra vonatkozó pontos statisztikai adatok még nem ismertek, de az európai népességben átlagosan 10% körül van a *BRCA1* és 5% alatt a *BRCA2* gént érintő exon deléciók és duplikációk aránya az összes kóroki mutáción belül [72].

A *BRCA1*-ben és a *BRCA2*-ben előforduló mutációk az esetek döntő többségében egymást kizáró jellegűek, ezért a klinikai diagnosztikában bevett gyakorlatnak számít, hogy miután valakiben azonosítják teljes gén-szekvenálással a kóroki mutációt, a család többi tagjánál már csak ezt az egy pontot ellenőrzik [73]. Ritka esetekben viszont előfordulhat, hogy egy beteg mindkét *BRCA* génjében mutációt hordoz [74]. A jelenséget „kombinált vagy dupla heterozigótaságnak” nevezzük, az érintett személyek többsége pedig az Ashkenazi zsidó populációból kerül ki, akiknél közismerten jóval gyakoribb az örökletes *BRCA* mutációk előfordulása [75]. A statisztikai felmérések azt mutatják, hogy a *BRCA1* és a *BRCA2* génjünkben is mutációt hordozóknál nem alakul ki korábban az emlő- és petefészekrák, mint a csak egy mutáns *BRCA* génnel rendelkezőknél, azonban ilyenkor is fontos, hogy mindkét mutáció azonosítva legyen az öröklődés megfelelő vizsgálhatósága miatt [76]. Még ennél is ritkábban fordulnak elő olyan esetek, amikor a *BRCA1* vagy a *BRCA2* gén mindkét kópiája inaktív lesz örökletes mutáció következtében. Ezt a jelenséget a szakirodalom

biallél-inaktivációnak nevezi, és elsősorban a *BRCA2* esetében számoltak be róla [77], ahol a mutáció érintheti mindkét allélon ugyanazt a pontot (homozigóta) vagy két különböző pontot (komplex heterozigóta). A *BRCA2* gén biallél-inaktivációja atipikus Fanconi-anémia kialakulásához vezet, ami jóval súlyosabb tünetekkel jár, mint a betegség klasszikus változata: a központi idegrendszer és a vérképző szervek rosszindulatú daganata, vastagbélrák, stb. Eddig a *BRCA2* gén esetében 31 ilyen biallél-mutációt írtak le, összesen 23 családban [78]. A *BRCA1* gén esetében csak egyetlen ilyen esetet ismerünk, a komplex heterozigóta biallél-mutáció ennél a betegnél alacsony termetet, microcephaliát és már 28 éves korban petefészek-daganatot eredményezett [79].

2.7. A HBOC rizikócsoportha tartozók diagnosztikai és terápiás lehetőségei

Az örökletes *BRCA* mutációk gyakorisága az átlagpopulációban elenyésző, gyakran még a 0,1%-ot sem éri el [37]. Ezért azoknak az egyéneknek a szelektálása, akiknél genetikai teszt elvégzése az örökletes *BRCA1* vagy *BRCA2* mutációk kimutatása céljából indokolt, jól meghatározott kritériumok szerint történik, melyek elsősorban a rák családi halmozódásának aspektusait veszik figyelembe a következő szempontok alapján [80]:

- Emlőrák 35 éves korban vagy korábban.
- Két vagy több elsőfokú rokon emlőrákkal (átlagéletkor <50 év) vagy petefészekrákkal (bármely életkorban).
- Három vagy több közeli rokon emlő- és/vagy petefészekrákja két generációban (legalább egy daganat 50 év alatt).
- Férfi emlőrák (bármely életkorban).
- A családban kimutatott *BRCA* mutáció.

Ezeket a szigorú feltételeket azonban nem minden emlő-és/vagy petefészek-daganatos beteg (HBOCS), illetve hozzátartozója teljesíti, akiknél felvetődik az örökletesség gyanúja. Ez többek között annak tulajdonítható, hogy a *BRCA1* vagy a *BRCA2* kóroki mutációja gyakran apai ágon öröklődik, másrészt a napjainkban gyakori kislétszámú családok esetén nehezebben lehet tetten érni a családi halmozódást. Ezért előfordulhat, hogy olyan betegek és hozzátartozóik nem jutnak hozzá a genetikai szűréshez, akiknél egyébként az indokolt lenne [49].

Amennyiben a genetikai teszt valakinél igazolja a *BRCA1-2* hordozói státuszt, különböző fokozatú megelőző lépések foganatosítására van lehetőség, melyek egyöntetűen arra irányulnak, hogy a daganat kialakulását megelőzzék, a korai felismerést elősegítsék és a daganatterápiás eljárások hatékonyságát növeljék [81]. Az, hogy a gyakorlatban a kezelőorvosok milyen megoldást választanak a felsorolt preventív lehetőségek közül, országonként is nagy eltéréseket mutathat. Amerikában nagyon gyakran emlő és/vagy petefészek-eltávolító műtétet javasolnak a tumor kialakulásának megelőzése céljából [82,83]. Ezzel szemben az európai gyakorlat ennél jóval kevésbé drasztikus, elsősorban a fokozott ellenőrzések (mammográfia, ultrahang) és egészségesebb életmód szorgalmazására összpontosít [11].

A preventív lépések foganatosításán túl egyre nagyobb jelentősége van a *BRCA* mutáns daganatok személyre szabott kezelésének. Az utóbbi évek kutatási eredményei ugyanis jelentős áttörést hoztak a *BRCA1-2* mutáns emlő- és petefészek-daganatok PARP (poli[ADP-ribóz] polimeráz) inhibitorokon (PARPi) alapuló, célzott terápiájában. A PARP enzimek a DNS-hibajavítás különböző folyamataiban vesznek részt [84], már a DNS-károsodásra adott válaszfolyamatok első lépéseiben aktiválódnak, elősegítve a báziskivágó DNS-hibajavítást (BER: base excision repair) és az egyes szálú DNS-törések (SSBR: single strand break repair) kijavítását [85]. Azokban a sejtekben,

amelyekben a HR-es hibajavítás *BRCA1-2* mutáció miatt nem működik megfelelően, egy másik DNS-hibajavító mechanizmus (BER és SSBR) mesterséges gátlása PARP inhibitorokkal a sejtek halálát okozza [86]. Így lehetővé válik, hogy szelektíven csak a tumorsejteket pusztítsuk el, ugyanis a működőképes *BRCA1-2*-vel rendelkező normál testi sejtek sokkal kevésbé érzékenyek a PARP inhibitorokra [87]. Az Európai Gyógyszer Ügynökség (European Medical Agency, EMA) 2014 decemberében engedélyezte az első PARP inhibitorot, az olaparibot (kereskedelmi neve Lynparza), recidiváló, platina-szenzitív serosus petefészek-daganatok harmadik vonalbeli monoterápiájára [88]. A gyógyszer felírási kritériuma a tumor vagy vérmintából igazolt örökletes, vagy szomatikus *BRCA1* vagy *BRCA2* patogén, illetve nagy valószínűséggel patogén mutáció megléte [89]. Számos további PARP inhibitor jelölt van klinikai tesztelési fázisban, így a következő években várhatóan újabb célzott gyógyszerek jelennek meg más, *BRCA* mutáns daganatok terápiájára is [90]. Ezért most minden eddiginél nagyobb aktualitása van gyors, pontos és megbízható diagnosztikai módszer fejlesztésének, mely alkalmas a *BRCA1-2* mutációk azonosítására vér- és tumormintából egyaránt.

2.8. A *BRCA* mutációk azonosítására használt diagnosztikai módszerek

A *BRCA1-2* gének mutációinak szűrésére már az 1990-es évek elején történt felfedezésük után nagy igény mutatkozott. Az évek során különböző módszerek váltották egymást, melyek között szerepelt a protein trunkációs teszt (PTT), SSCP (Single-Strand konformációs analízis), HRM (High Resolution Melting analízis), stb. Ezek elsősorban előszűrési módszerként voltak használatosak, szekvencia-szintű információt nem szolgáltatottak [91]. Pozitív eredmény esetén ezért minden alkalommal

Sanger szekvenálással történő megerősítésre volt szükség. Később már egyre jobban elterjedt az előszűrés nélküli direkt szekvenálás gyakorlata [92]. A kapilláris, vagy Sanger szekvenálás a mai napig a mutációk azonosításának „gold-standard”-ja a molekuláris diagnosztikában, mely alkalmas báziscserék, illetve kisebb Indelek kimutatására [93,94]. A teljes exonokat érintő deléciók és duplikációk kimutatására azonban egy másik módszer, az MLPA (Multiplex Ligálásos Próba Amplifikálás) alkalmazása szükséges [95]. Mivel a *BRCA* gének viszonylag nagyméretűek és a bennük előforduló mutációk a génen belül bárhol lehetnek, az MLPA-val kombinált Sanger szekvenálás igencsak költséges és időigényes diagnosztikai eljárást eredményez. Az igény, hogy tumorszövetből izolált DNS-mintából is lehetőség legyen *BRCA1-2* mutációk keresése, újabb kihívás elé állította a hagyományos diagnosztikai módszereket. A tumorszövet ugyanis heterogén, normál és tumor sejteket egyaránt tartalmaz, a vad típusú háttér magas aránya pedig veszélyeztetheti a szomatikus mutációk detektálásának képességét [96]. Ezért alacsony tumor arány esetén a Sanger szekvenáláson alapuló módszer megbízhatatlanná válik. A felmerülő problémákra megoldást jelentett az újgenerációs szekvenáló platformok (NGS: next generation sequencing) megjelenése 2005-ben [97]. Ezek a nagy áteresztőképességű készülékek ugyanis lehetővé teszik egyszerre sok DNS-minta nagy mélységben történő szekvenálását. A szekvenálási mélység (lefedettség) növelése pedig lehetővé teszi alacsony arányban jelenlévő szomatikus mutációk detektálását is [98].

Az asztali méretű újgenerációs szekvenáló platformok elterjedésével a diagnosztikai laboratóriumok számára is lehetőség nyílt arra, hogy *BRCA1-2* mutáció-detektálási folyamataikat ezekre a berendezésekre helyezték át. Ennek eredményeként sorra jelentek meg a különböző NGS platformokra fejlesztett *BRCA1-2* diagnosztikai eljárások, melyek döntő többsége csírvonal-mutációk kimutatására fókuszál, amit

perifériás vérből izolált, jó minőségű genomi DNS felhasználásával végeznek [99–103]. A tumorminták többsége viszont formalinnal fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) szövet. Emiatt az ezekből a mintákból izolált DNS különbözik a vérből izolált DNS-től, és olyan sajátos jellemvonásokkal rendelkezik, amelyek a diagnosztikai folyamatot megnehezíthetik [104]. Az FFPE mintákból izolált DNS gyakran limitált mennyiségű és gyenge minőségű, a formalinos fixálás miatt ugyanis deaminálódnak a bázisok. Szintén a formalin fixálás miatt alakulnak ki a keresztkötések, amelyek a DNS kisebb nagyobb fragmentáltságát idézik elő [105]. A fragmentáltság miatt az FFPE DNS mintákból csak limitált hosszúságú fragmentek amplifikálhatóak, a gyenge minőségű és mennyiségű DNS templát pedig nagymértékben megnövelheti a PCR és szekvenálási hibák arányát [106]. Az FFPE mintákból végzett mutáció-analízis tehát sok szempontból kihívást jelent, többek között ez az oka annak, hogy kevés publikáció számol be FFPE mintából történő, szomatikus mutációk kimutatására is alkalmas *BRCA1-2* diagnosztikai módszerek kifejlesztéséről [107]. Ismert olyan tanulmány is, amely az FFPE minta helyett fagyasztott szövetből izolált DNS-en végzett mutáció-analízist javasol a fent említett problémák kiküszöbölésére [108]. A gyakorlat azonban azt mutatja, hogy nem áll rendelkezésre minden esetben ilyen natív szövetet a molekuláris diagnosztika elvégzéséhez, így mindenképpen olyan módszer fejlesztésére kell törekedni, ami FFPE szövetből izolált DNS mintán is lehetővé teszi a *BRCA* mutációk gyors és pontos meghatározását.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A *BRCA* gének inaktiválódása a tumorevolúció folyamatának fontos lépését képezi több daganattípus esetén is. A gének inaktiválódáshoz vezető genetikai elváltozások kimutatása és tanulmányozása ezért elsődleges fontosságú ahhoz, hogy a tumorigenezis folyamatát megismerjük, illetve annak kimenetelét befolyásolni tudjuk. A többféle eredetű biológiai minta (vér, nyál, FFPE) és mutációtípus (SNP, Indel, LGR), továbbá a célzott terápiák megjelenése a *BRCA1-2* esetében egy olyan új diagnosztikai eljárás kidolgozását teszi szükségessé, amely képes magába integrálni az igények sokaságát, megbízható módszert nyújtva az örökletes és sporadikus *BRCA* mutációk kimutatására. Doktori munkám során ezért egy olyan komplex *BRCA* diagnosztikai eljárás kidolgozását tűztem ki célul, amely a fent említett igények és elvárások integrálásával diagnosztikai és kutatási célokra egyaránt alkalmas. Ezt a kutatási és fejlesztési folyamatot az alábbi lépésekben terveztem kivitelezni:

1. Multiplex PCR reakción alapuló target dúsítási eljárás kidolgozása a *BRCA1* és *BRCA2* gének genomi DNS-mintából történő amplifikálására és újgenerációs szekvenálásra alkalmas fragmentkönyvtár-készítés optimalizálása.

2. Hozzájárulni egy, az újgenerációs szekvenálási adatok elemzésére szolgáló bioinformatikai programcsomag kifejlesztéséhez. Az adatelemzés és mutáció-analízis folyamatának tesztelése kóroki *BRCA* mutációt hordozó kontroll mintákon.

3. A kidolgozott munkafolyamat validálása Ion Torrent PGM és Illumina MiSeq újgenerációs szekvenátorokon. A szekvenálási adatok és mutáció-analízis eredményének összehasonlítása a két platform között.

4. A kidolgozott diagnosztikai módszer tesztelése FFPE tumormintákon. A *BRCA* tumorevolúció folyamatának vizsgálata ovárium tumorokban.

4. ANYAG ÉS MÓDSZEREK

4.1. Betegminták és DNS

Az ismert patogén mutációval rendelkező *BRCA1* (n=18; 1. Táblázat) és *BRCA2* (n=6; 1. Táblázat) sejtvonalkat a “Coriell Mutant Cell Repository” (Camden, NJ, USA) sejtbankból szereztük be. Ezeket a referencia mintákat használtuk a diagnosztikai munkafolyamat optimalizálása során.

Nr	Coriell ID	Gén	Mutáció	Exon
1	NA14090	<i>BRCA1</i>	c.66_67delAG	3
2	NA14638		c.213-11T>G	5
3	NA14684		c.797_798delTT	11
4	NA14094		c.1175_1214del40	11
5	NA14093		c.1204delG	11
6	NA13709		c.2068delA	11
7	NA13712		c.2155_2156insA	11
8	GM14096		c.3481_3491delGAAGATACTAG	11
9	NA13705		c.3756_3759delGTCT	11
10	NA14634		c.4065_4068delTCAA	11
11	NA13710		c.4327C>G	13
12	NA14637		c.4327C>T	13
13	NA13708		c.4752C>G	16
14	NA14095		c.5200delG	18
15	NA14092		c.5201T>C	18
16	NA13715		c.5326_5327insC	20
17	NA13714		c.5319_5320insC	21
18	NA14636		c.5621_5622insA	24
19	NA14623	<i>BRCA2</i>	c.125A>G	3
20	NA14624		c.5718_5719delCT	11
21	NA14170		c.5946delT	11
22	NA14639		c.6198_6199delTT	11
23	NA14622		c.6275_6276delTT	11
24	NA14626		c.9976A>T	27

1. Táblázat. A Coriell sejtbankból származó csírvonal-minták *BRCA* mutációi.

A Bács-Kiskun Megyei Kórház munkatársai rendelkezésünkre bocsájtottak további 22 betegmintát (2. Táblázat), amelyekben előzőleg Sanger szekvenálással már azonosították a *BRCA1* vagy *BRCA2* mutációt. Ezek a minták szolgálták a diagnosztikai folyamat validálására.

Gén	Mutáció típusa	Elnevezés
<i>BRCA1</i>	SNV (polimorfizmusok kizárva)	c.181T>G
		c.5251C>T
		c.5074 G>C
	Inszerciók/deléciók	c.843_846delCTCA
c1016_1017insA		
c.1961delA		
c.2985delTCTCA		
c.3700_3704delGTAAA		
c.3756_3759delGTCT		
c.4065_4068delTCAA c.5266dupC		
Nagy átrendeződések	del(ex21_22)	
	dup(ex13)	
<i>BRCA2</i>	SNV (polimorfizmusok kizárva)	c.5645C>A
		Inszerciók/deléciók
c.1813dupA		
c.5073dupA		
c.5351_5352insA		
c.5946delT		
c.7910-7914delCCTTT		
c.9098_9099insA c.9403delC		

2. Táblázat. A validációban felhasznált DNS minták. Az SNV-k (pontmutációk) leggyakrabban semleges hatású polimorfizmusokat takarnak, a mi esetünkben azonban olyan báziscserékről van szó, amelyek a fehérje funkcióját befolyásolják, ezért patogén mutációnak minősülnek. A nagy genomi átrendeződések kimutatására használt *BRCA1* mutáns referencia mintákat is ebben a táblázatban összegeztük.

Az ováriumtumor-mintákon történő teszteléshez a SZTE ÁOK Pathologiai Intézete biztosított számunkra ováriumtumorból izolált DNS mintákat. Tíz beteg esetében lehetőségünk volt arra is, hogy a tumormintát a neki megfelelő nem tumoros DNS-sel (FFPE metszet csak egészséges szövetet tartalmazó része vagy perifériás vérminta) párban vizsgáljuk. Valamennyi beteg aláírásával járult hozzá, hogy DNS-ét kutatási célra is felhasználjuk. A biológiai mintákból genomi DNS-t izoláltunk PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA-USA), illetve High Pure FFPE DNA Isolation Kit (Roche, IN, USA) felhasználásával.

4.2. Multiplex PCR alapú target amplifikálás

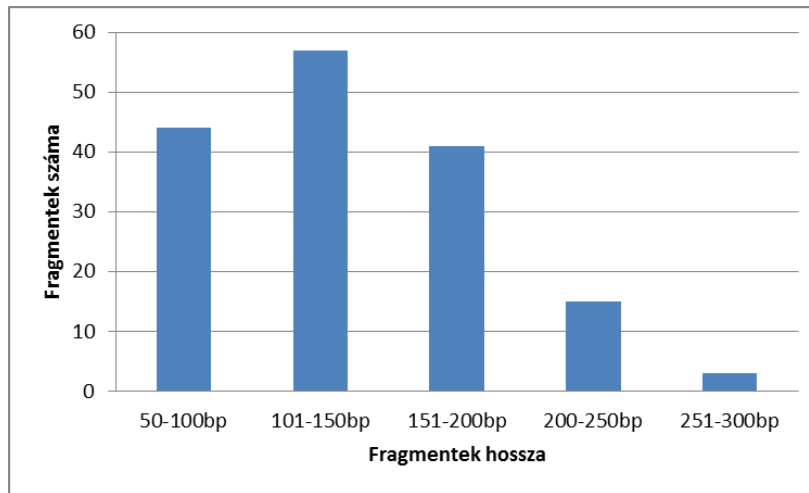
A humán genomból amplifikálni kívánt rész a *BRCA1* (NM_007294.2) és *BRCA2* (NM_000059.3) kódoló exonjaiból, valamint az exon-intron határokból állt. Ezeket az exonokat övező intron régiókat 10 és 50 bázispár közötti hosszúságúra hagytuk, kivéve néhány olyan esetet, ahol a primertervezési kritériumok miatt ez a szakasz rövidebb lett: *BRCA1* exon 9 és *BRCA2* exon 9, 14, és 17. Ennél mélyebb introni mutációkat is jeleztek már néhány tanulmányban, de ezek gyakorisága elhanyagolható, a fehérje működésére gyakorolt hatása pedig megkérdőjelezhető. Így összességében elmondhatjuk, hogy a *BRCA1* és a *BRCA2* gének amplifikálásra általunk kijelölt részek magukba foglalják a patogén mutációk döntő többségét, beleértve az intronikus splice-site mutációkat is. Az amplifikáláshoz szükséges primerek tervezését az ingyenesen elérhető Primer3 nevű szoftverrel végeztük [109]. Minden primert ellenőriztünk dimerképződés szempontjából, az ön- és kereszt-dimerizálódást is megvizsgálva a templátfüggetlen primer-extenzió elkerülése céljából. Az így megtervezett 80 primerpár szintézisét az IDT (Integrated DNA Technologies -

Coralville, Iowa, USA) cégtől rendeltük meg. A primerpárokat először egyszerű PCR reakcióban teszteltük 20ng genomi DNS és 10 μ M primer felhasználásával. Ezt követően a primerpárokat kilenc multiplex csoportra osztottuk: négy multiplex csoportot hoztunk létre a *BRCA1* gén, illetve ötöt a *BRCA2* esetében. A primerpárok által amplifikált fragmentek hossza 186 és 812 bázispár között változik. A *BRCA1* multiplex PCR reakciókat 35 μ l térfogatban végeztük 1 \times PCR puffer, 2,0 mM $MgCl_2$, 2,5 mM dNTPs, 1,5 egység Taq DNS polimeráz (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) és 20-50 ng templát DNS felhasználásával. Az amplifikálást a következő PCR körülmények mellett végeztük: 95°C/2 perc iniciális denaturálás; 35 ciklus 95°C/20 s; 63,5°C/30 s; 72°C/50 s; végül, 2 perc 72°C végső extenzió. A *BRCA2* esetében alkalmazott multiplex reakció kissé különbözik ettől: 25 μ l-es térfogatban végeztük 0,7 egység Phusion High Fidelity Polimeráz, 5xHF puffer és 10mM dNTP (Thermo Scientific) jelenlétében. A reakciókörülmények ebben az esetben a következők voltak: 98°C/2 perc; 35 ciklus 98°C/20 s; 63,5°C/30 s; 72°C/50 s; és 72°C/2 perc végső extenzió. Az egyes primerpárok koncentrációját a különböző multiplex csoportokban optimalizálás útján határoztuk meg. Ez 0,05 és 0,2 pmol/ μ l primer-koncentráció között változott a végső reakció-térfogatban primerpártól és multiplex csoporttól függően. A multiplex PCR reakciók termékéből 10 μ l-t futtattunk meg mennyiségi és minőségi kontrollként 4%-os agaróz gélen.

4.3. Fragmentkönyvtár-készítés és újgenerációs szekvenálás

Miután mind a kilenc multiplex reakcióban sikerült az összes fragmentet amplifikálni, az ugyanazon mintához tartozó négy *BRCA1* multiplex, illetve öt *BRCA2* multiplex reakció termékeit összekevertük 1:1 arányban. Végül a *BRCA1*-multiplex

keveréket és a *BRCA2* multiplex-keveréket is összeöntöttük egymással 2:3 arányban. Erre azért volt szükség, mert a *BRCA2* gén lényegesen nagyobb méretű, mint a *BRCA1*. Így minden minta esetében a 9 kiindulási PCR termékből egyetlen keveréket kaptunk, ezzel dolgoztunk a továbbiakban. Első lépésként kitisztítottuk a keveréket 100bp-nál hosszabb fragmenteket megkötő PCR tisztító kit-el (Geneaid, Taiwan). A keverékben lévő PCR amplikonok széles méretspektruma miatt (200-800bp) további fragmentálásra volt szükség ahhoz, hogy azok az újgenerációs szekvenátorok leolvasáshossz tartományába beleférjenek. Erre a célra a restrikciós enzim alapú fragmentálást választottuk, mint hatékony és reprodukálható DNS fragmentálási módszer, amely az utána következő adapterligálási lépést is megkönnyítheti. A fragmentáláshoz alkalmas enzimeket a négy-nukleotidos felismerő helyű enzimek között kerestük, mivel ezek viszonylag gyakoriak, és elméletileg 250 bp-os fragmentáltságot biztosítanak, ami optimális hosszúság az újgenerációs szekvenátorok számára is. *In silico* fragmentálást modelleztünk a Clone Manager 9 (Scientific & Educational Software, Denver, CO, USA) szoftver segítségével az összes olyan négyes felismerő helyű enzimmel, amelyek hasítás után ragadós véget generálnak. Az így tesztelt enzimeket rangsoroltuk a hasítással generált fragmentek mérete és száma alapján, továbbá, hogy az általuk generált vég kompatibilis-e más négyes felismerő helyű enzimével. Végül három restrikciós enzim felelt meg valamennyi szempontból az elvárásainknak: az MseI (NEB, Ipswich, MA), a Csp6I és a FspBI (Thermo Scientific). Ennek a három enzimnek optimális felismerőhely-eloszlása van a *BRCA* géneken belül ahhoz, hogy 50-300 bp közötti hosszúságú fragmenteket generáljon (4. Ábra), továbbá mindhárom enzim 5'-TA ragadós véget képez, így ugyanazokat a szekvenáló adaptereket lehet majd a keletkező DNS-fragmentekhez hozzá ligálni.



4. Ábra. A *BRCA1* és *BRCA2* ampliconok méreteloszlása az enzimatis fragmentálást követően.

Mivel többféle restrikciós enzimet használtunk a fragmentáláshoz, átfedő fragmentek is keletkeztek, hasonlóan a random szonikáláshoz (Függelék F2. Ábra). Azt is figyelembe vettük, hogy ha egy enzim-felismerő hely mutáció miatt inaktiválódik, akkor legyen a közelben mindkét oldalán másik olyan hely, amely biztosítja a lefedettséget a mutáns hely fölött. Két egymás mellett lévő hasítóhely elmutálódásának valószínűségét elhanyagolhatónak tekintettük. Az esetek többségében a primerek 5' végén is szükség volt hasítóhelyet kialakítani annak érdekében, hogy a fent említett optimális fragmentáltság biztosított legyen, illetve, hogy a specifikus adaptereket az amplifikált fragmentek végére is rá tudjuk ligálni. A restrikciós emésztéseket a gyártó utasításának megfelelően hajtottuk végre. Egy DNS-mintán mindhárom enzimmel végeztünk egyes és kettős emésztéseket is. Az emésztést követően a reakciókat ismét PCR tisztító kit (Geneaid, Taiwan) segítségével tisztítottuk. Ezt követően Illumina MiSeq- vagy Ion Torrent PGM-specifikus adaptereket ligáltunk az emésztés után kapott DNS fragmentekre.

Illumina szekvenálás esetén a ligáláshoz Nextera típusú adaptereket használtunk, kiegészítve azok szekvenciáját a TA ragadós véggel:

N501-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-index-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG

N701-TACTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC-index-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTGA.

Ion Torrent szekvenálás esetén az alábbi adapter szekvenciákat használtuk:

A-TTCCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGindex

P1-TAATCACCGACTGCCCATAGAGAGGAAAGCGGAGGCGTAGTGG

Az adapter szekvenciákat az IDT-től (Integrated DNA Technologies - Coralville, Iowa, USA) rendeltük, majd a komplementer szálakat PCR gépben hibridizáltuk össze. Az így kapott kettősszálú adaptereket ligáltuk hozzá a restrikciós emésztéssel kapott DNS fragmentekhez T4 DNS Ligáz (Thermo Scientific) felhasználásával. A ligálás végén DNS Polimeráz I-et (Thermo Scientific) adtunk a reakcióhoz, amely a ligálás után maradt réseket (nick) a fragmentek végére „tolja” (nick-transzlálás). Végül a teljes reakcióterfogatot 2%-os agaróz géltre vittük fel, és futtatás után visszaizoláltuk a gélből a 200-400 bp közötti mérettartományba eső fragmenteket gélizoláló kit (Viogene, Taiwan) segítségével. Az így kapott DNS-fragmentkönyvtárat qPCR segítségével kvantitáltuk (Kapa Biosystems) LightCycler480 qPCR (Roche, Indianapolis, IN) készülékben.

Az Illumina szekvenálásokat MiSeq készüléken végeztük 2x150 ciklusos Standard flow cell v2 felhasználásával, követve a gyártó utasításait. Az Ion Torrent PGM szekvenáláshoz Ion PGMTM Template OT2 200 Kitet használtunk az Ion OneTouch 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) készülékkel. A keletkező ion sphere részecskéket (IPS) az ES (Enrichment System) modulon tisztítottuk és 200

bp-os konfigurációval szekvenáltuk az Ion Torrent PGM platformon 316-os méretű szekvenáló chip felhasználásával.

4.4. Bioinformatikai adatelemzés

A *BRCA* diagnosztikai munkafolyamat fejlesztésének kezdeti szakaszában kereskedelmi forgalomban kapható szoftvereket is kipróbáltunk az újgenerációs szekvenálás során keletkező adatok elemzésére (CLC Genomic Workbench, Torrent Browser, MiSeq Reporter). Az optimalizálás folyamatának előrehaladásával azonban egyértelművé vált, hogy ezek nem felelnek meg minden tekintetben az elvárásainknak, ezért szükségét láttuk egy saját adatelemző szoftver kifejlesztésének, amely az NGSeXplorer nevet kapta.

Az NGSeXplorer illesztő-algortmusa a Burrows–Wheeler transzformáción és a Smith-Waterman algoritmuson alapszik [110,111]. A szoftver egyik speciális funkciója a primer szekvenciák felismerése és eltávolítása a leolvasások végéről. Ez egy fontos lépés a variáns-keresés előtt, hiszen nélküle a primer szekvenciák értékes mutációkat fednének el, amelyeket a variáns-elemző modul így nem találna meg, illetve nem tartana szignifikánsnak. Az NGSeXplorer az adatelemzés rész-, illetve végtermékeit olyan kimeneti fájlformátumokba rendezi, amelyek kompatibilisek más adatelemző szoftverek bemeneti fájlkezelő rendszereivel. Ezek közül a legfontosabb az illesztési adatokat tömörítő BAM formátum (Binary Alignment/Map format) és a variánsokkal kapcsolatos információkat magába foglaló VCF formátum (Variant Call Format). A VCF kimeneti fájl az NGSeXplorer esetében tartalmazza az adott mintában azonosított variánst (báziscserék, Indelék), annak pontos helyét a genomban, a variánshoz tartozó különböző minőségi paramétereket (lefedettség mélysége, leolvasott bázis minősége [quality

score], stb.), a variáns típusát (csendes, misszensz, nonszensz, frameshift, in-frame), valamint klinikai besorolását (semleges, patogén, ismeretlen) különböző általános és génspecifikus adatbázisok (BIC, Ensembl, stb.) bejegyzései alapján. A VCF-ben listázott variánsokat minden esetben vizuális ellenőrzéssel validáljuk, ellenőrizve, hogy a feltüntetett adatok megfelelnek-e az illesztési képnek. Amennyiben a variáns valószínűleg bizonyul, egy visszakereshető adatbázisba kerül annak a betegmintának az azonosítójával kapcsolatban, amelyben találtuk. A szoftver a hitelesített (validált) variáns mellé automatikusan odarendeli a következő paramétereket is: gén, exon, eredeti/variáns szekvencia, dbSNP szám (rs#), HGVS (Human Genom Variation Society) elnevezés és a variáns allél frekvenciája (VAF).

Az NGSeXplorer variánskereső részét olyan szűrő-applikációkkal egészítettük ki, melyek segítenek megkülönböztetni a szekvenálási hibákat a valódi mutációktól:

Szálarány eltérés: Ez az alkalmazás felismeri és szekvenálási hibának minősíti azokat a variánsokat, amelyek csak egyik szekvenálási irányból detektálhatók, vagy a két irányban nagyon nagy eltérést (> 35%) mutat a frekvenciájuk.

Mélység teszt: a fragmentálásnak köszönhetően a gén egy adott pontját egyszerre több pozícióból induló szekvenciák is lefedhetik. Ezeket a különböző „mélységből” kiinduló, az eredeti és a variáns szekvenciát tartalmazó leolvasásokat Mann–Whitney U tesztnel vizsgáljuk az alkalmazás [112]. Felismeri és szekvenálási hibának minősíti azokat a variánsokat, melyek frekvenciája szignifikánsan eltér a különböző mélységből induló leolvasások között.

Annak érdekében, hogy az Ion Torrent szekvenátor homopolimer DNS szakaszokra jellemző szekvenálási hibáit (fals inszerciók és delécioók) még inkább kiküszöbölhessük, létrehoztunk egy adatbázist 20 vad típusú DNS-minta *BRCA1-2* Ion Torrent szekvenálási adataiból. Ez az adatbázis tartalmazza a *BRCA* gének teljes

szakaszán előforduló inszerciós és deléciós változások frekvenciáit, amelyek - vad típusú mintákról lévén szó - egy szekvenálási alapzajnak tekinthetők. Azok a helyek a *BRCA1-2* génen, amelyeken ennek a frekvenciának az értéke nem haladja meg a 10%-ot (gépi hiba), alacsony hibakockázatú pozícióknak tekinthetők. Ha egy újonnan szekvenált, ismeretlen státuszú minta Indel frekvenciája egy ilyen pozícióban eléri a 25%-os detektálási küszöböt, akkor valódi variánsnak tekinthető. Ha ez a 25% egy olyan DNS szakaszon fordul elő, ahol az Indelek alapzaja eleve meghaladja a 10%-ot, akkor az alábbi variáns-szűrők segítenek eldönteni, hogy valódi Indellel van-e dolgunk vagy szekvenálási hibával:

Gyűrűződés: Ennek a variáns-szűrőnek a működése azon a feltevésen alapszik, hogy ha egy valódi egybázisos inszerció történik valamely homopolimer szekvenciában, akkor ennek a frekvenciája nagyobb kell, hogy legyen, mint amit a statisztikai adatbázis tartalmaz erre az inszercióra nézve. Ezen kívül a kétbázisos inszerció frekvenciája is megnő ezen a helyen az adatbázisban mérthez képest.

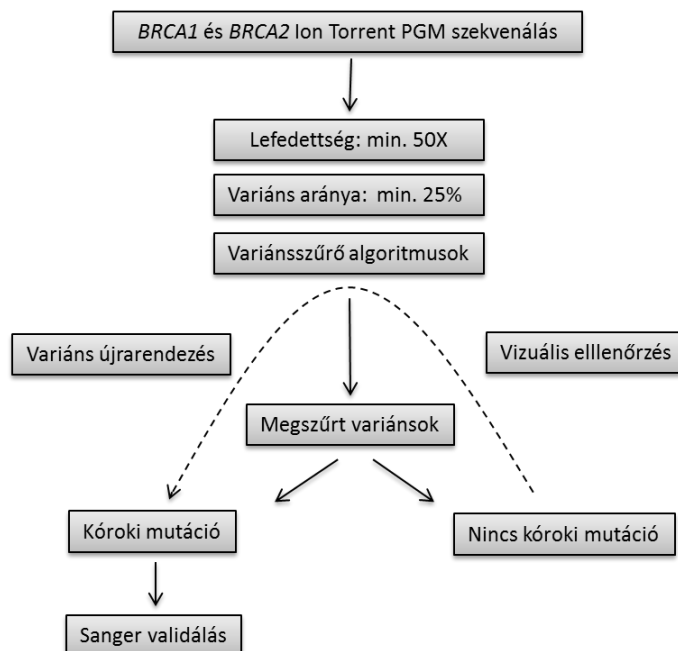
Deléció-elmozdulás: Ha egy valódi egynukleotidos deléció történik egy homopolimer DNS szakaszon, akkor a plusz-mínusz egy nukleotidos Indelek aránya megváltozik az adatbázisban mérthez képest. Vagyis, ha a deléciók aránya nő, az inszerciók aránya pedig csökken, akkor az egy valódi deléciós eseményre utal.

Homopolimer (HP) százalék: Megfigyeléseink az mutatják, hogy egy HP szakaszon mért Indel frekvenciájának értéke gyakran korrekcióra szorul az ilyen szakaszokon nagy gyakorisággal előforduló szekvenálási hibák miatt. A korrekció, amit ebben az esetben alkalmazunk, megegyezik az ellenkező irányú esemény adatbázisbeli és az adott mintában mért frekvenciájának különbségével. Ezt az értéket **anti-HP**-nek nevezzük, míg az ezzel feljavított Indel frekvenciája a **HP-százalék**. Ez a variáns-szűrő jól

meghatározott algoritmus alapján hajtja végre a szükséges korrekciókat (Függelék, F1. Ábra). Működéséről a Függelék F1. Táblázatban több eset-példát is bemutatunk.

Variáns újrendezés: Ez az alkalmazás azonosítja az összes, egy bázisnál hosszabb alacsony frekvenciájú Indelt és újrailleszti körülötte a leolvasásokban lévő bázisokat annak érdekében, hogy az Indel lehetséges hosszát maximalizálni tudja.

Az Ion Torrent szekvenálási adatok esetében tehát a variáns-keresést a fent ismertetett variáns-szűrők bevonásával végeztük. Ennek a folyamatnak a vázlatát az 5. Ábra szemlélteti.



5. Ábra. A variáns-keresésre kidolgozott munkafolyamat vázlatát Ion Torrent szekvenálási adatok esetén

4.5. Nagy genomi átrendeződések kimutatása

Az újgenerációs szekvenáláshoz használt amplikonok általában túl rövidek ahhoz, hogy nagyobb Indeleket közvetlenül detektálni lehessen velük. Az

amplikonokról keletkező leolvasások mennyisége azonban arányos a kiindulási templát mennyiségével, így ennek az aránynak a megváltozásából már lehet következtetni olyan duplikációs (inszerció) vagy deléciós eseményekre is, amelyek egész exonokat, sőt akár a teljes gént is érintik. Ezért a multiplex PCR amplifikáláson és újgenerációs szekvenáláson alapuló diagnosztikai eljárásunkat teszteltük nagy genomi átrendeződések – elsősorban exon deléciók és duplikációk– kimutatására is. Erre a célra az Illumina MiSeq szekvenálások lefedettségi adatait (leolvasások száma) használtuk fel. A tesztet két olyan mintán végeztük el (2. Táblázat), amelyeket előzőleg már MPLA analízissel megvizsgáltunk az MLPA BRCA1 kit (MRC Holland, Amsterdam) felhasználásával, a gyártó utasításait követve. Ennek a két tesztmintának a lefedettségi adatait hasonlítottuk össze három, vad típusú referencia minta átlagával. Mindkét tesztmintából három párhuzamos amplifikálást és szekvenálást végeztünk (triplikátum). A normalizálást és az összehasonlítást külön-külön végeztük el a *BRCA1* amplifikálására szolgáló négy multiplex PCR reakció esetében, a mások által már korábban leírt eljárás szerint [113]. Összefoglalva, ahhoz, hogy egy minta amplikonjának dózishányadosát (dosage quotient – DQ) megállapítsuk, szükség van az amplikonhoz tartozó multiplex csoport abszolút leolvasásszámára, amelyet az ebbe a multiplex csoportba tartozó valamennyi amplikonról keletkezett leolvasások összegeként állapítottuk meg. Ezután minden mintára kiszámoltuk az összes amplikon relatív leolvasásszámát, amelyet az amplikon leolvasásszáma és az amplikonhoz tartozó multiplex csoport abszolút leolvasásszáma közötti hányadosként határoztunk meg. Végül a minták amplikonjainak relatív leolvasásszámát elosztottuk a referenciák átlagával, ami megadta annak az amplikonnak a DQ-ját az adott mintában. A számítás képletbe foglalva az alábbiak szerint néz ki: $DQ_{\text{test}}^i = (RC^i/RC^{\text{all}})_{\text{test}} / (RC^i/RC^{\text{all}})_{\text{ref}}$ ahol

“RC”= read count (leolvasás szám); “i” = ampikon i; “all” = összes ampikon;
“test” = teszt minta; és “ref ” = referencia minta.

4.6. Formalinnal fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) tumorminták vizsgálata

A kidolgozott diagnosztikai eljárást FFPE mintákon is teszteltük. Az elsőként vizsgált tíz FFPE tumorminta esetében párhuzamosan perifériás vérmintát (vagy ahol ez nem volt lehetséges, ott nem tumoros, normál szövetmintát) is vizsgáltunk, annak érdekében, hogy a két különböző eredetű mintából kapott eredményeket összehasonlíthassuk. A *BRCA1* és *BRCA2* multiplex PCR alapú amplifikálását bizonyos esetekben szükséges volt kiegészíteni singleplex PCR reakciókkal is az FFPE DNS gyengébb minősége miatt. Sikeres amplifikálást követően a keletkezett PCR termékekből fragmentkönyvtárat hoztunk létre a már korábban ismertetett módon, és a mintákat Illumina MiSeq platformon szekvenáltuk. A keletkező szekvenálási adatok elemzéséhez és a mutáció kereséshez az NGSeXplorer szoftvert használtuk szomatikus variáns-keresésre adaptálva: minimum 100-as lefedettség és legalább 10% variáns allél gyakoriság. A sikeres tesztelést követően további 25 ováriumtumor-mintában határoztuk meg a *BRCA* gének mutációs státuszát.

4.7. A mutáció-analízis érzékenységének vizsgálata

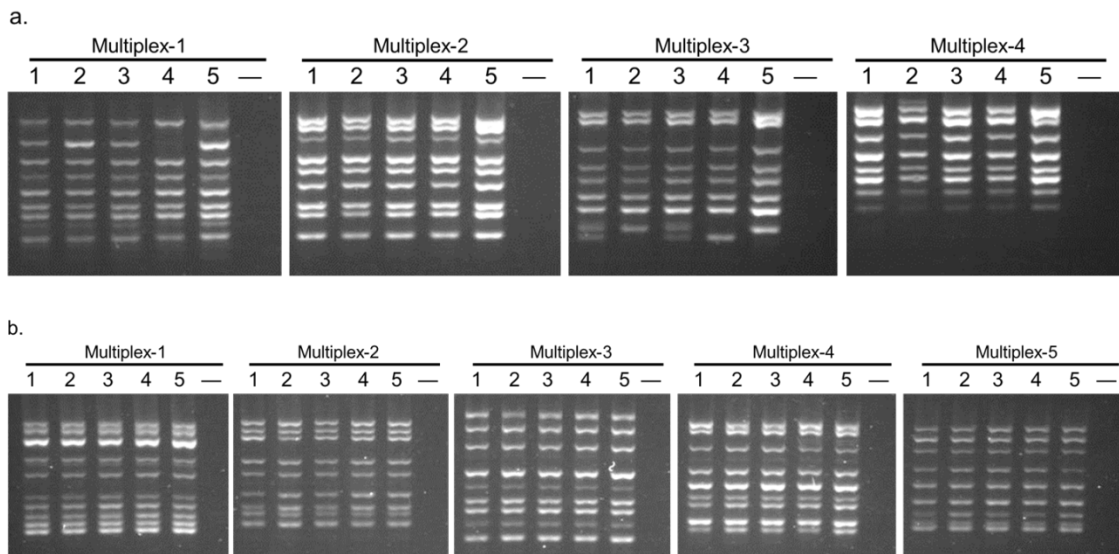
Ahhoz, hogy ellenőrizhessük, valóban alkalmas-e az általunk kidolgozott módszer alacsony variáns allél gyakoriság detektálására is, hígítási sort készítettünk mutáns (*BRCA1*: c.5263_5264insC) és vad típusú FFPE DNS keverékéből csökkenő mutáns aránnyal: 1/2, 1/4, 1/8 és 1/16. A kiindulási minták DNS tartalmát NanoDrop spektrofotométerrel (Thermo Scientific) kvantitáltuk, majd a megfelelő arányokban

kevertük őket. A keverék mintákból az eddigiekhez hasonlóan fragmentkönyvtárat készítettünk és az FFPE mintákkal párhuzamosan megszekvenáltuk őket Illumina MiSeq platformon. Végül az NGSeXplorerrel végzett adatelemzést követően összehasonlítottuk a várt és kapott allél-frekvenciákat a különböző arányú keverékekben.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A *BRCA* mutációk azonosítására kifejlesztett diagnosztikai módszer tesztelése

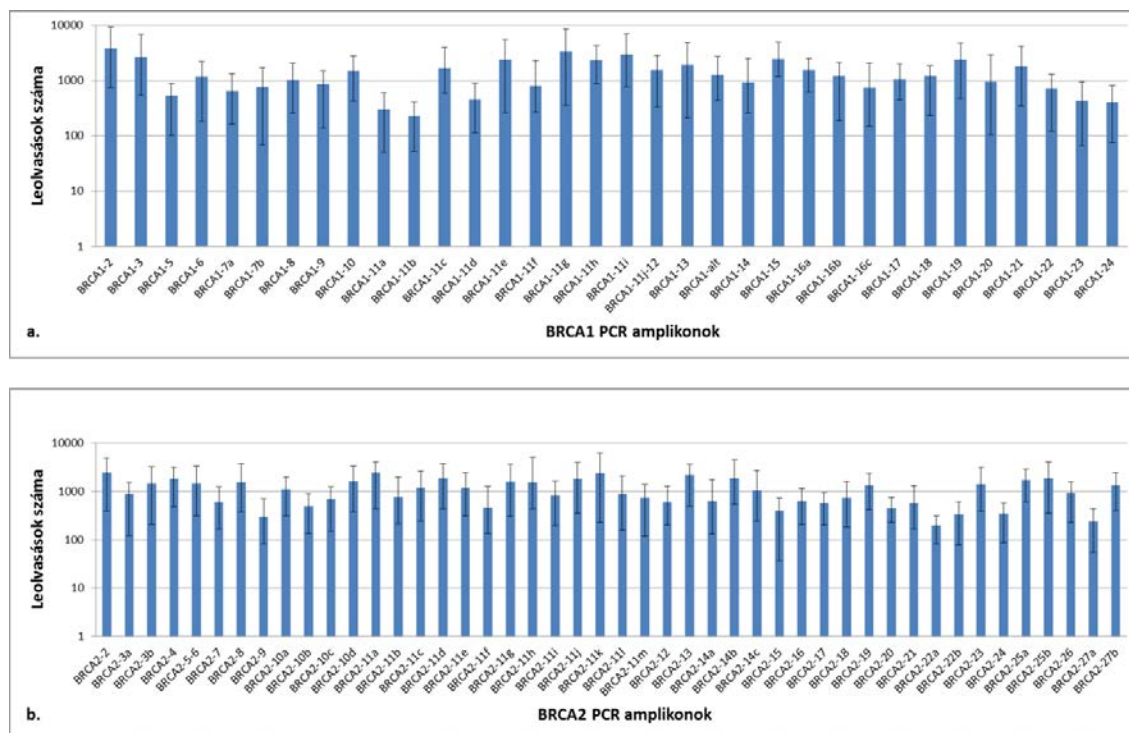
A *BRCA1* és *BRCA2* génekben előforduló mutációk azonosítására kidolgozott diagnosztikai folyamat első tesztelését 24 olyan DNS-mintán végeztük el, amelyekben a *BRCA* mutáció már előzőleg ismert volt. Ezeket a DNS mintákat a Coriell (Camden, NJ, USA) mintabankból szereztük be, és úgy válogattuk össze őket, hogy minél több olyan mutációt tesztelhessünk, melyek meghatározása a rutin diagnosztikai gyakorlatban egyébként nehézkes lehet. Ilyenek a különböző hosszúságú inszerciók és deléciók, valamint a homopolimer régiókban előforduló mutációk (1. Táblázat).



6. Ábra. A *BRCA1* és *BRCA2* gének amplifikálása Coriell DNS mintákból. **a.** A *BRCA1* gén amplifikálására szolgáló négy multiplex PCR reakció. **b.** A *BRCA2* gén amplifikálása öt multiplex PCR reakcióban. A PCR fragmentek mérete 200-800 bázispár között változik. 1-5: öt különböző DNS minta, —: DNS nélküli negatív kontroll.

A diagnosztikai folyamat első lépése a *BRCA* gének amplifikálása a genomi DNS mintákból. A multiplex PCR reakciók optimalizálása során olyan primer-csoportokat hoztunk létre, amelyekben valamennyi primer-pár megfelelő erősségű terméket ad az amplifikálás során, az így keletkező fragmentek pedig méret alapján jól elkülöníthetők egymástól 4%-os agaróz gélen. Ennek eredményeként a *BRCA1* gén amplifikálása négy, a *BRCA2*-é pedig öt multiplex PCR reakcióban történik. A multiplex reakciók előzetes optimalizálásának köszönhetően mind a 24 Coriell mintából sikerült amplifikálni az összes PCR amplikont (6. Ábra). A sikeres amplifikálást követően DNS-fragmentkönyvtárat állítottunk elő a mintákból az előzőleg már ismertett módon, és újgenerációs szekvenáló platformon szekvenáltuk őket. A 24 minta elkülönítését az adatelemzés során a ligálási lépésnél hozzájuk adott egyedi index v. barcode szekvenciák tették lehetővé.

A lefedettségi adatok elemzéséből kiderült, hogy a megfelelően optimalizált kísérleti körülményeknek köszönhetően, sikerült lefedni a teljes *BRCA1* és *BRCA2* gént, a lefedettség mélysége pedig egyenletes megoszlást mutatott a különböző amplikonok között (7. Ábra). A mintánként kapott átlagos leolvasás szám 133 ezer, míg az átlagos lefedettség 689x-es volt. Az NGSeXplorer variánskereső algoritmusait úgy optimalizáltuk az egyes filterek küszöbértékének növelésével ill. csökkentésével, hogy mind a 24 mintában megtalálja az ismert patogén mutációt. Ezen optimalizálás folyamán nagy figyelmet fordítottunk a hosszú Indelek illesztésének és azonosításának pontosságára (8. Ábra). A mi esetünkben két mintában volt ilyen jellegű mutáció: egy 11 bp-os deléció a GM14096-ban és egy 40 bp-os deléció a NA14094 jelzésű mintában. Az NGSeXplorer ezeket is megfelelő módon illesztette és azonosította (8. Ábra).



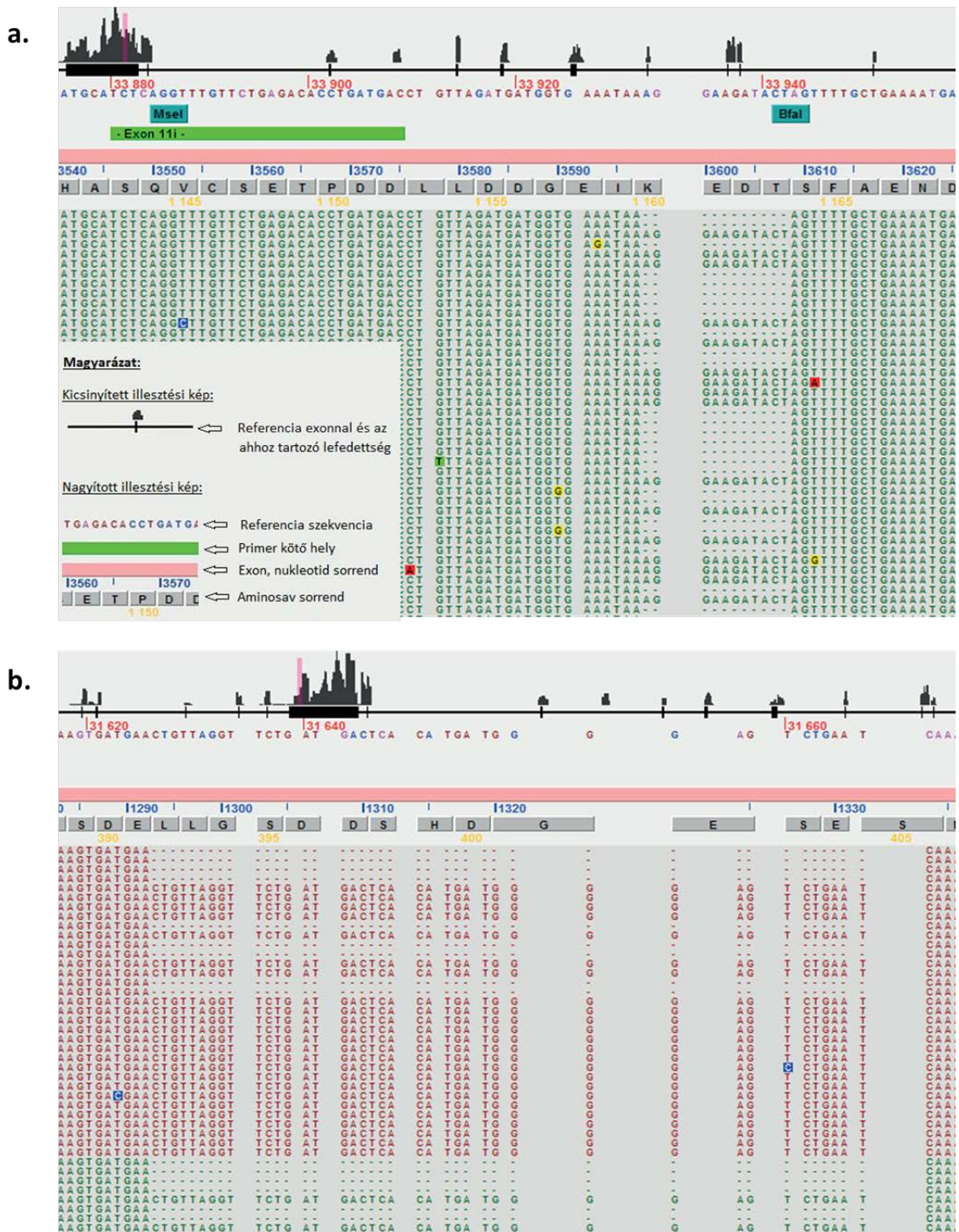
7. Ábra. Az Illumina MiSeq szekvenálással kapott leolvasások eloszlása a *BRCA1* (a.) és *BRCA2* (b.) PCR ampliconok között. Egy adott amplicon esetében a lefedettség az ampliconon belül kijelölt több referencia pont mérési átlagából származik. Ez volt tovább átlagolva a mérésben részt vevő 24 minta között.

A hosszú Indelek azonosításának reprodukálhatóságát úgy teszteltük, hogy az ilyen mutációt tartalmazó mintákat több alkalommal szekvenáltuk, majd variáns elemzést végeztünk a kapott adatokon az NGSeXplorer segítségével. A reprodukálhatósági kísérletek lefedettségi és variáns-keresési eredményeit a 3. Táblázatba foglaltuk össze.

Indel	c.3481_3491delGAAGATACTAG		c.1175_1214del40	
Szekvenálás	NGS1	NGS2	NGS1	NGS2
Illesztett leolvasások	127 591	140 112	165 866	153 689
Átlagos lefedettség	105x	160,5x	196,9x	485,2x
Lefedettség	303x	435x	334x	660x
VAF	36,30%	35,40%	53,89%	47,42%

3. Táblázat. Nagy Indelek detektálásának reprodukálhatósága.

Átlagos lefedettség: a gén több pontján mért lefedettségi értékek átlaga. Lefedettség: az adott Indel pozíciójában mért lefedettségi érték. VAF – variáns allél frekvenciája.



8. Ábra. Nagy Indelek illesztésének grafikus megjelenítése az NGSExplorer segítségével: a. *BRCA1* c.3481_3491delGAAGATACTAG variáns a GM14096 referencia mintából. A zöld színű szekvenciák a forward irányú leolvasásokat jelölik. A referenciától eltérő bázisok (mismatch) háttérre színezett (amplifikálási és szekvenálási hibák). b. *BRCA1* c.1175-1214del40 variáns a NA14094 referencia mintából. A piros színű szekvenciák a reverz irányú leolvasásokat jelölik.

5.2. A *BRCA* mutációk azonosítására kifejlesztett diagnosztikai módszer validálása

Az optimalizálással egybekötött sikeres tesztelési fázist követően, a diagnosztikai módszert 20 olyan betegmintán validáltuk (2. Táblázat), melyekben ugyan előzőleg már meg volt határozva a *BRCA1* vagy *BRCA2* mutáció, de annak pontos helye a validálást végző személy előtt ismeretlen maradt. A 20 mintából készített DNS-fragmentkönyvtárat Illumina MiSeq és Ion Torrent PGM platformokon is megszekvenáltuk, összehasonlítva a kutatásban és diagnosztikában leggyakrabban használt két szekvenáló berendezéssel kapott eredményeinket. A szekvenálások során kapott adatokat ezúttal is az NGSExplorer szoftver segítségével elemeztük. A két platformra vonatkozó szekvenálási paramétereket, a leolvasások számát és a lefedettségi értékeket a 4. Táblázatban foglaltuk össze.

Szekvenálási paraméterek	Illumina MiSeq	Ion Torrent PGM
Flow cell/chip típus	Standard v2	316
Össz leolvasás szám	14M	915k ill. 1,25M
Átlagos leolvasás hossz	99,3bp	99,24bp
Leolvasások átlag quality értéke (Phred)	33,79	24,24
Átlag leolvasás/minta	247 749	99 774
Illeszthető leolvasások aránya	76%	88%
Átlagos lefedettség [min, max]	1 262 [304, 2100]	439 [159, 1326]
Min. 50x lefedettségű target részek aránya	99,93%	99,68%
Inszerciók aránya	0,01%	1,27%
Deléciók aránya	0,04%	0,67%
Báziscserék aránya	0,29%	0,23%

4. Táblázat. Az Illumina MiSeq és Ion Torrent PGM platformokon végzett szekvenálások mennyiségi és minőségi paramétereinek összegzése. A szekvenálási paramétereknél feltüntetett értékeket a validálási folyamatba bevont 20 csíravonal-minta átlagából számoltuk. A minimum és maximum lefedettségi értékek a minták közötti eltérésre vonatkoznak.

Az átlagos leolvasás-hossz az Illumina és Ion Torrent esetén is hasonló volt, azt elsősorban az enzimatis emésztés során keletkező fragmentek méreteloszlása határozta meg (4. Ábra). Mindkét gyártó egyedi szoftveres algoritmust használ a leolvasott bázisok minőségi értékének (Quality score) becslésére, így azok összehasonlítása nehézkes, még annak ismeretében is, hogy az Ion Torrent általában alulbecsüli, míg az Illumina kissé túlbecsüli a leolvasott bázisok minőségét [114]. A keletkezett leolvasások referencia szekvenciához történő illesztése után megállapítható, hogy a báziscserés hibák aránya a két platform esetében hasonló (0,29 és 0,23 szubsztitúció 100 bázisra vonatkoztatva Illumina, illetve Ion Torrent esetében). Az inszerciók és deléciók arányának összehasonlításából kiderült, hogy az Ion Torrent PGM által generált leolvasásokban 1,27 inszerció és 0,67 deléció volt 100 bázisonként (4. Táblázat), míg Illumina esetében ezek a hibák csak minimális arányban voltak megfigyelhetők (0,01 és 0,04). Mivel heterozigóta arányban jelen levő mutációkat kerestünk, ezért a mutációk kereséséhez a variáns allél küszöbértéket 25%-ban állapítottuk meg úgy pontmutációk, mint Indelek esetén (célszerű az elméleti 50%-nál kisebb értéket megadni, mert az amplifikálások során eltolódhat az allélarány alacsonyabb irányba). A mutáció kereséshez minimálisan szükséges lefedettség 50x-ben volt meghatározva.

5.2.1. Mutáció-analízis Illumina MiSeq szekvenálás esetén

A saját tervezésű bioinformatikai szoftverünk (NGSeXplorer) segítségével mind a 20 validációs mintában sikeresen azonosítottuk a *BRCA* mutációkat. Fals negatív vagy fals pozitív találat nem volt az eredmények között (5. Táblázat). Ennek köszönhetően az Illumina MiSeq szekvenátorral egybekötött *BRCA* diagnosztika kísérleti szenzitivitása

$[VP/(VP + FN)]$ 100%-os volt (VP a valós pozitív variánsok száma, FN pedig a fals negatívoké). Valós negatív variánsok hiányában a specificitást a fals pozitív (FP) rátával fejeztük ki $FP/(FP + VP)$, melynek értéke így 0% lett.

Talált variánsok		NGS Platform	
		Illumina MiSeq	Ion torrent PGM
Összes	Fals pozitív	0	26
	Fals negatív	0	16
	Valós pozitív	140	124
	Valós negatív		982
Kóroki	Fals pozitív	0	16
	Fals negatív	0	1
	Valós pozitív	20	19
	Valós negatív		680

5. Táblázat. A validációs minták mutáció-analízisének eredménye.

5.2.2. Mutáció-analízis Ion Torrent szekvenálás esetén

A mutáció-analízis kezdeti szakaszában az NGSeXplorer az összes lehetséges variánst kilistázza az Ion Torrent szekvenálás adatai közül (jelen esetben 1148 variáns 20 mintában) a variáns-szűrők alkalmazása nélkül (5. Táblázat). Ezt követően a variáns-szűrők szekvenciális aktiválásával igyekeztünk minimálisra csökkenteni a fals pozitív találatok arányát anélkül, hogy közben valódi variánsokat veszítenénk el (6. Táblázat). Az optimalizálással egybekötött tesztelési fázisban az alábbi küszöbértékeket rendszeresítettük az egyes variáns-szűrők esetében: mélységteszt 5, gyűrűződés 20%, deléció-elmozdulás 30%, HP-százalék 25% és szálarány eltérés 35%. Az egyes szűrő-

alkalmazások küszöbértéken túli szigorítása ugyan tovább csökkentené a fals találatok számát, de azzal párhuzamosan valódi mutációkat is elveszítenénk.

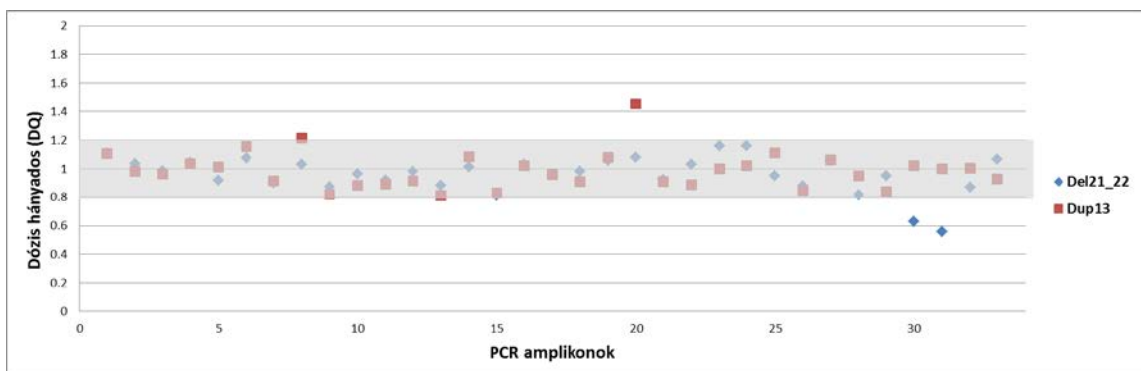
Variáns-szűrők	Variánsok száma	
	Összes	Kóroki
Összes variáns	1,148	715
Mélység teszt	1,072	669
Gyűrűződés	565	293
Deléció elmozdulás	261	101
HP százalék	228	71
Szálarány eltérés	166	36

6. Táblázat. A variáns-szűrő algoritmusok szekvenciális alkalmazása az Ion Torrent adatokra.

A Ion Torrent adatok esetében a 20 validációs mintából 9-ben csak a valódi mutáció maradt meg a variáns-szűrést követően, míg 10 másik minta esetében a valódi mutáció mellett bennmaradt még további 1-4 fals pozitív patogén mutáció is. A fennmaradó egy minta esetében a variáns-szűrés után nem maradt mutáció, ugyanis az egyik szűrőalkalmazás nem ismerte fel valódinak a mutációt. Ez egy Adenin/Timin báziscsere volt (c.5645A>T), amit a szekvenciában további négy Adenin követett (homopolimer régió). A mutációt a szálarány-eltérés minősítette szekvenálási hibának, mivel a reverz leolvasásokon a homopolimer régió miatt a variáns bázis körül az átlag-minőség a Q10-es küszöbérték alatt volt, és így ezeket a leolvasásokat a szoftver nem tudta figyelembe venni a mutáció-analízis során. Összességében az Ion Torrent adatokon végzett mutáció-analízis 95%-os kísérleti érzékenységgel és 97,3%-os specifikussággal rendelkezett. Ez utóbbit a következő képlet alapján számoltuk: $[VN/(VN + FP)]$. A diagnosztika általános pontossága $[VP + VN/(VP + VN + FP + FN)]$ pedig 97,2% lett.

5.3. Nagy genomi átrendeződések kimutatása

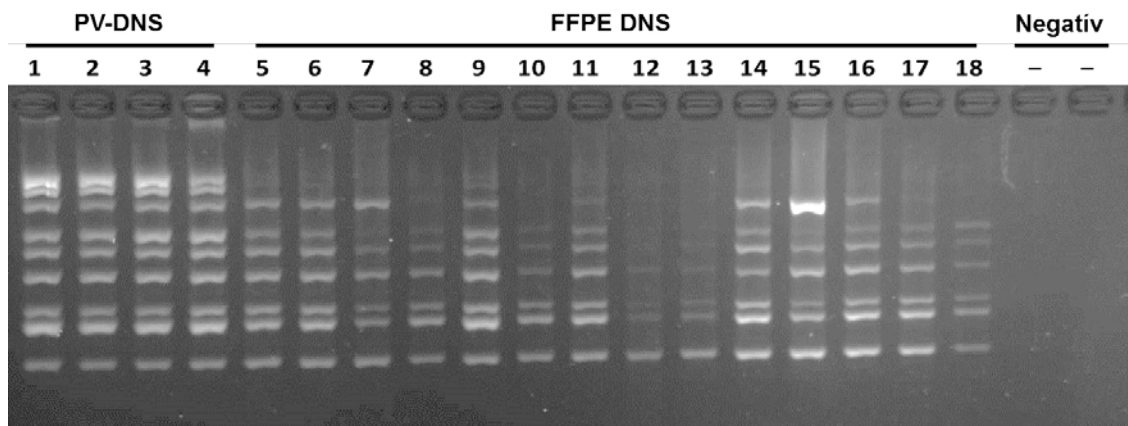
A *BRCA1* génben az exon deléciók és duplikációk meghatározására az Illumina MiSeq platform által generált leolvasásszámokat használtuk bementi adatként. Kiszámoltuk az átlagos DQ-t (dózis hányados) mind a 36 *BRCA1* fragment esetében, négy különböző csoportba rendezve azokat a négy multiplex PCR reakciónak megfelelően. A dózis hányadost a teszt- és referenciaminták normalizált leolvasásszámainak arányaiból számoltuk, ahogy azt korábban a módszereknél részleteztük. A négy különböző csoport értékeit egy közös grafikonon ábrázoltuk. A 36 amplicon DQ értékei három mérettartományba sorolhatók: 0,5 (0,55-0,63 között), 1,0 (0,81-1,2 között) és 1,5 (1,45), annak megfelelően, hogy az általuk amplifikált exon hány példányban van jelen az adott mintában (1,0 - normál példányszám; 0,5 - deléció; 1,5 - duplikáció). Az ampliconok DQ értéke alapján elmondhatjuk, hogy az egyik tesztmintában 21_22 exon deléció, míg a másikban 13-as exon duplikáció történt (9. Ábra). Ezek az eredmények megegyeznek az MLPA analízis eredményeivel.



9. Ábra. Az exon deléciók és duplikációk kimutatására szolgáló dózishányadosok grafikus ábrázolása. Egy pont a grafikonon egy, triplikátumban amplifikált és szekvenált *BRCA1* PCR ampliconról kapott lefedettségi értékek átlagolt és vad típusú mintához normalizált dózishányadosát (DQ) jelenti.

5.4. *BRCA* tumorevolúció vizsgálata tumormintákon

A *BRCA* tumorevolúció folyamatának nyomonkövetése érdekében elsőként tíz petefészek daganatos beteg *BRCA* mutációs státuszát vizsgáltuk meg. Ehhez a vizsgálathoz rendelkezésünkre állt FFPE (formalinnal fixált és paraffinba ágyazott) tumorszövetből izolált DNS (tumor-DNS) és normál szövetből (nem tumoros FFPE szövet, vagy perifériás vér) izolált DNS minta is. Az FFPE mintákból izolált DNS minőségi és mennyiségi korlátai miatt csak részben amplifikálható. Ahogy a 10. Ábrán is látszik, a multiplex PCR reakciókban a nagy molekulású PCR fragmentek nem, vagy csak kismértékben amplifikálódtak. Ezért ezekben az esetekben, a multiplexben PCR reakciókban nem amplifikálódó fragmenteket singleplex reakciókkal egészítettük ki. Ezt követően a már ismertetett módon DNS-fragmentkönyvtárat állítottunk elő a mintákból és Illumina MiSeq platformon szekvenáltuk őket 2x150bp konfigurációjú szekvenáló kit segítségével. A szekvenálási adatokat az NGSeXplorer szoftver segítségével elemeztük.



10. Ábra. *BRCA1* Multiplex-2 PCR reakció FFPE szövetből izolált DNS mintákon. 1-4: Perifériás vérből (PV) izolált DNS (pozitív kontroll), 5-18: FFPE szövetből izolált DNS, —: DNS nélküli negatív kontroll. A PCR fragmentek mérete 200-800 bázispár között változik. 4%-os agaróz gél.

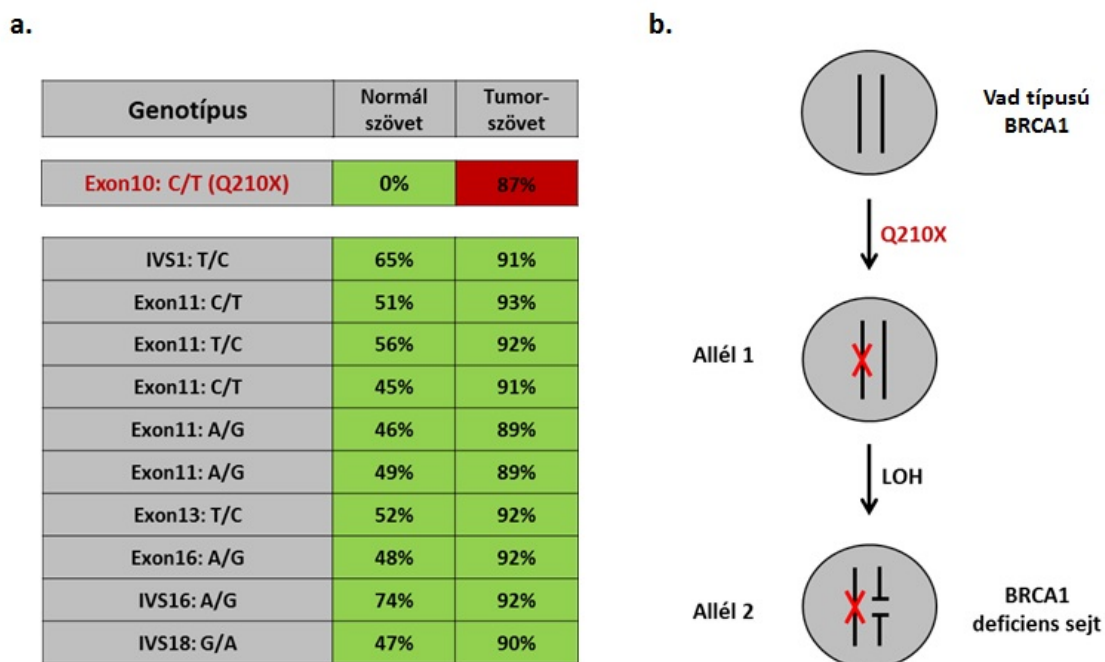
A minták lefedettségi adatainak elemzése 100%-os lefedettséget mutatott a *BRCA* génekre nézve, köszönhetően a multiplex amplifikálás singleplex reakciókkal történő kiegészítésének. Az átlagos szekvenálási mélység 2000x-es és 841x-es, míg az átlagos leolvasásszám 458 ezer, illetve 230 ezer volt a tumorminták, illetve azok normál párja esetében. Ezt követően mutáció-analízist végeztünk a mintákon, melynek eredményeit a 7. Táblázat foglalja össze.

Minta	Szövettypus	Mutációs státusz
NT-1	Perif. vérminta	WT
	Tumor FFPE-50%	WT
NT-2	Normál FFPE	<i>BRCA1</i> : c.5263_5264insC
	Tumor FFPE-30%	<i>BRCA1</i> : c.5263_5264insC
NT-3	Perif. vérminta	WT
	Tumor FFPE-30%	WT
NT-4	Perif. vérminta	WT
	Tumor FFPE-60%	WT
NT-5	Perif. vérminta	<i>BRCA1</i> : c.5263_5264insC
	Tumor FFPE-80%	<i>BRCA1</i> : c.5263_5264insC
NT-6	Perif. vérminta	WT
	Tumor FFPE-60%	WT
NT-7	Perif. vérminta	WT
	Tumor FFPE-60%	WT
NT-8	Normál FFPE	WT
	Tumor FFPE-80%	<i>BRCA1</i> : c.628C>T
NT-9	Perif. vérminta	WT
	Tumor FFPE-80%	WT
NT-10	Perif. vérminta	<i>BRCA1</i> : c.5370C>T
	Tumor FFPE-70%	<i>BRCA1</i> : c.5370C>T

7. Táblázat. Tíz ovárium FFPE tumor és normál szövetminta vizsgálata során kapott eredmények összegzése. Az FFPE minták tumor arányát molekuláris patológus állapította meg vizuális becslés alapján. Az összehasonlításban limfocitákból (perifériás vér) vagy az FFPE minta nem tumoros részéről izolált DNS szolgált normál referenciaként. Az NGS szekvenálással azonosított kóroki mutációk és polimorfizmusok részletes táblázata a Függelékben található (F2. Táblázat).

A 10 tumormintából négyben találtunk olyan kóroki mutációt, amelyekről ismert, hogy a daganat kialakulásában szerepet játszanak. Valamennyi mutáció a *BRCA1*-ben volt jelen: két mintában egy kereteltoló (frameshift) inszerciót azonosítottunk (c.5263_5264insC), másik két mintában pedig egy-egy stop-kodon mutációt (c.628C>T és c.5251C>T). A normál szövetből izolált DNS szekvenálását követő mutáció-analízis rámutatott arra, hogy a négy mutáció közül három már a csírvonalban is jelen volt, és csak egy tumorminta hordoz szomatikus *BRCA* mutációt: ez a c.628C>T; p.Q210* mutáció volt az NT-8 minta esetében. Mind a négy mutációt megerősítettük Sanger szekvenálással is. A tumor és normál szövetminták a kóroki mutációkon kívül még tartalmaztak semleges és ismeretlen hatású polimorfizmusokat is homozigóta és heterozigóta formában egyaránt (Függelék F2. Táblázat).

Az NT-8 mintában azonosított c.628C>T mutáció új, egyik adatbázis sem tartalmazza, ezért 41127-es azonosítóval jelentettük azt a COSMIC adatbázis kezelőinek. A mutáció allélaránya ebben a tumormintában meghaladta a 80%-ot. Ugyanakkor az is megfigyelhető volt, hogy olyan csírvonalbeli *BRCA1* polimorfizmusok, melyek a beteg normál szövetében heterozigóta formában voltak jelen, a tumormintában homozigóta irányba tolódtak el (11.a. Ábra). Mindez arra utal, hogy míg a *BRCA1* gén egyik allélja stop-kodon mutációval rendelkezik, addig a megmaradt, vad típusú allél nagyobb genomai átrendeződés által veszett el (LOH: loss of heterozygosity). Az eredmények alapján felvázoltunk egy modellt, amely a *BRCA* tumorevolúció lehetséges lépéseit ábrázolja az NT-8 ovárium tumor esetében (11.b. Ábra).



11. Ábra. A NT-8 számú ováriumtumor-minta tumorevolúciós modellje (Welsh és King [53] nyomán). **a.** A *BRCA1* gén újgenerációs szekvenálása során kapott mutáció (piros) és a polimorfizmusok (fekete) allélarányának összehasonlítása normál szövet és tumorminta esetén. **b.** Az eredmények alapján felállított *BRCA1* tumorevolúciós modell.

Ezt követően újabb 25 ováriumtumor-minta *BRCA* mutációs státuszát is megvizsgáltuk (8. Táblázat). A diagnosztikai módszer ebben az esetben is megfelelően működött. A szekvenálás során az átlagos lefedettség itt is közel 2000x-es volt, ami mintánként átlagosan 450 000 leolvasást igényelt. A 25 tumormintából 12-ben találtunk kóroki mutációt (48%), melyek közül 10 megtalálható a *BRCA1-2* csírvonal-mutációkat összesítő adatbázisban is (BIC). A másik két mutáció közül az egyik (c.7795G>T) a ClinVar adatbázisban szomatikus mutációként van regisztrálva, míg a másik (c.1236insT) mutáció egyetlen adatbázisban sem szerepelt. A csírvonal-mutációk közül a leggyakoribb a *BRCA1 c.5263_5264insC*, amelyik négy mintában is jelen volt. A másik két leggyakoribb mutáció a *BRCA1 c.181T>G* és a *BRCA2 c.9976A>T*, melyeket két-két mintában is megtaláltuk. A többi mutációt egy-egy alkalommal azonosítottuk. A mutáns mintákban az előbb ismertetett NT-8 mintához hasonlóan itt is

megfigyelhető, hogy a mutáns allél aránya a homozigóta irányba tolódik el. Ez alól csupán négy minta volt kivétel.

ID	Tumor arány	Illesztett leolvasások	Átlagos lefedettség	Mutációs státusz	VAF
OV-1	50%	730K	2231x	WT	-
OV-2	5%	182K	608x	WT	-
OV-3	80%	1.2M	4241x	WT	-
OV-4	N.D.	400K	1142x	BRCA1 c.1236insT	83%
OV-5	N.D.	244K	721x	BRCA1 c.5263_5264insC	87%
OV-6	85%	394K	1101x	WT	-
OV-7	50%	152K	691x	WT	-
OV-8	15%	246K	1289x	WT	-
OV-9	40%	166K	835x	WT	-
OV-10	40%	274K	1263x	BRCA2 c.9976A>T	50%
OV-11	60%	145K	740x	BRCA1 c.181T>G	88%
OV-12	40%	188K	973x	WT	-
OV-13	80%	287K	1748x	WT	-
OV-14	80%	365K	2039x	WT	-
OV-15	2%	306K	1816x	BRCA1 c.66_67delAG	52%
OV-16	60%	309K	1825x	BRCA1 c.5263_5264insC	77%
OV-17	50%	431K	3168x	BRCA2 c.9976A>T	50%
OV-18	60%	227K	1590x	BRCA1 c.5263_5264insC	73%
OV-19	60%	387K	2345x	BRCA1 c.181T>G	75%
OV-20	60%	380K	2063x	BRCA1 c.5263_5264insC	83%
OV-21	40%	438K	2646x	WT	-
OV-22	65%	410K	2408x	BRCA2 c.7795G>T	78%
OV-23	60%	332K	2081x	WT	-
OV-24	60%	1.7M	5521x	WT	-
OV-25	40%	1.3M	4100x	BRCA1 c.5370C>T	54%

8. Táblázat. 25 ovárium FFPE tumorminta szekvenálásának és mutációanalízisének összefoglaló táblázata. Pirossal vannak jelölve a csírvonal-mutációk, kékkel a szomatikus mutációk. Az FFPE minták tumor arányát vizuálisan, becslés alapján molekuláris patológus állapította meg. Rövidítések: K-ezer, M-millió, VAF-variáns (mutáns) allél frekvenciája.

5.5. A mutáció-analízis érzékenységének vizsgálata

A tumorminták esetében azt is megvizsgáltuk, hogy melyik az a legalacsonyabb variáns allél frekvencia, amelynél a mutáció még nagy biztonsággal kimutatható a vad típusú háttérből. Mivel nem állt rendelkezésünkre olyan tumorminta ahol a mutáns allél aránya 50%-nál alacsonyabb lenne, ezért hígítási sort készítettünk mutáns és vad típusú minták felhasználásával. Az így kapott eredmények elemzése során kiderült, hogy a mutáns allélt csak a hígítási sor első két tagjában (1/2 és 1/4 arány) azonosította az NGSeXplorer variánslemezője az alapértelmezett beállítások mellett (100-szoros lefedettség, 5% variáns allél arány). Az eredmények vizuális ellenőrzéséből kiderült, hogy a másik két mintában (1/8 és 1/16 arány) is jelen van a mutáns allél, de jóval az 5%-os küszöbérték alatt (9. Táblázat).

Variáns	Hígítás	Várt variáns allél arány*	Kapott variáns allél arány	Lefedettség
BRCA1: c.5382insC	1/2	38.55%	30%	2552x
	1/4	19.27%	10.78%	1776x
	1/8	9.63%	3.92% **	3492x
	1/16	4.81%	2.70% **	2552x

9. Táblázat. Alacsony arányban jelen lévő mutáció azonosítása mutáns és vad típusú FFPE DNS keverékében. *A várt variáns allél arányt a hígítatlan mutáns FFPE DNS szekvenálási eredményéből számoltuk. **Ezeket az arányokat csak akkor észleltük, amikor a variánslemező küszöbértékét 5% alá csökkentettük.

6. DISZKUSSZIÓ

A disszertációban bemutatott, *BRCA* mutációk vizsgálatára kifejlesztett módszer a gének multiplex alapú amplifikálásán és a PCR termékek enzimatis fragmentálásán alapul, amelyet DNS-fragmentkönyvtár létrehozása és újgenerációs szekvenálás követ. Restriktív enzimek használata DNS fragmentálásra újgenerációs céljából nem számít széles körben elterjedt módszernek, az *MseI*-et viszont már korábban is sikeresen használták DNS fragmentálásra egy-sejt genomszekvenálás céljából [115,116]. A mi esetünkben az *MseI* általi fragmentálást kiegészítettük a *Csp6I* és az *FspBI* enzimmel. Mindhárom restriktív endonukleáz négy nukleotidos szekvenciát ismer fel, hasítás után pedig „TA” túlnyúló véget generál a DNS fragment 5' végén, ami megkönnyíti az adatpercek ligálását ezekhez a fragmentekhez.

A diagnosztikai folyamat beállítására és optimalizálására 24 különböző, ismert *BRCA* mutációval rendelkező csírvonal-mintát választottunk. A multiplex PCR és fragmentkönyvtár előkészítési lépéseinek megfelelő optimalizálását követően, mind a 24 mintát megszekvenáltuk Illumina MiSeq újgenerációs szekvenáló platformon. A kapott adatok feldolgozására és kiértékelésére először platformspecifikus szoftvereket is igénybe vettünk (Torrent Suite alkalmazás az Ion Torrent esetében, illetve MiSeq Reporter szoftver az Illumina adatokra). A diagnosztikai módszer optimalizálása során azonban egyértelművé vált, hogy a hatékony adatelemzés érdekében szükség van saját fejlesztésű bioinformatikai eszköz használatára is. Ezért fejlesztettük ki az NGSeXplorer nevű adatelemző szoftvert, amely pontos illesztési algoritmussal, lefedettség-generátorral és variánsazonosító-elemző egységgel is rendelkezik, Ion Torrent esetében kiegészülve a különböző variáns-szűrő alkalmazásokkal a szekvenálás minőségének *in silico* javítása érdekében [117].

Az újgenerációs szekvenálás esetében a pontos és megbízható mutáció-detektálás elsődleges feltétele, hogy a kiválasztott régió teljes terjedelmében és megfelelő mélységben legyen szekvenálva. Az elsőként vizsgált 24 minta lefedettségi adataiból egyértelműen látszik, hogy a *BRCA1* és *BRCA2* gének kiválasztott régiói 100%-ban le lettek fedve a PCR fragmentek, illetve a keletkező leolvasások által. A multiplex PCR alapú target dúsítási módszerek nagy kihívása, hogy a különböző amplikonok azonos vagy közel azonos mennyiségben termelődjenek a PCR során, hiszen a szekvenálásnál csak így lehet biztosítani azt, hogy a lefedettség a különböző amplikonok között kiegyenlített legyen (7. Ábra). Ezt a módszert optimalizálása során a primerpárok mennyiségének és a PCR reakciókörülmények változtatásával érték el (6. Ábra). Az, hogy egy adott génszakasz esetében mi az optimális lefedettségi mélység, minden esetben a kiindulási minta típusától és a variáns elemzés igényeitől függ. Csírvonal-minták esetében, ahol a variánsok általában legalább 50%-os allélaránnyal szerepelnek, 50-szeres lefedettség körül van az a minimális szekvenálási mélység, amelyet már mások is megbízhatónak tartanak [102,118]. Miután ezek a feltételek a 24 tesztminta esetében adottak voltak, a variáns elemzés valamennyi esetben helyesen azonosította a kóros mutációt, fals pozitív találatok nélkül, beleértve azt a két mintát is, amelyekben a nagy Indelet két független szekvenálásban is megvizsgáltuk (3. Táblázat).

A kezdeti tesztelési szakaszt követően újabb 20 csírvonal-mintát használtunk arra, hogy validáljuk a diagnosztikai folyamatot a legelterjedtebb újgenerációs szekvenátorokon: az Illumina MiSeq és az Ion Torrent PGM platformon. A szakirodalomban több olyan tanulmány is fellelhető, amely egy-egy újgenerációs platformra validál egy előre kidolgozott *BRCA* diagnosztikai munkafolyamatot: egyesek Ion Torrent PGM platformot használtak erre a célra [102,119], míg mások Illumina

HiSeq [118], vagy GS Junior (Roche454, Carlsbad) szekvenátort [120]. Az olyan közleményeknek azonban már jóval kevesebb a száma, amelyek ezt a *BRCA* diagnosztikai munkafolyamatot egyszerre több újgenerációs szekvenáló platformon is tesztelik [103]. A mi összehasonlításunkban a két asztali szekvenátor közül az Illumina MiSeq helyesen azonosította a kóroki mutációt mind a 20 mintában fals pozitív találat nélkül (5. Táblázat). Az Ion Torrent adatok esetében variáns-szűrő algoritmusokat alkalmaztunk a szekvenálási hibák által generált fals pozitív találatok kiküszöbölésére (6. Táblázat). Az Ion Torrent szekvenálási kémia legnagyobb hátránya az Illuminával szemben a homopolimer szakaszokban tapasztalt pontatlansága [114]. Az ilyen jellegű hibák aránya különösen nagy azokon a szakaszokon, ahol valódi variánsok/mutációk is előfordulhatnak [121], ez pedig nehézkessé teszi az adatelemzés során a szekvenálási hibák kiszelektálását anélkül, hogy a módszer általános érzékenységét rontanánk [122]. A mi esetünkben a variáns-szűrő algoritmusok alkalmazása drasztikusan csökkentette a fals pozitív találatok számát, amit a 97,3%-os specifikusság is mutat. Ugyanakkor a 20 mintából egy esetben valódi kóroki mutációt is szekvenálási hibának érzékelt az egyik szűrőalgoritmus, ami a diagnosztikai érzékenység nagyfokú csökkenését eredményezte (95%). Annak ellenére, hogy a fenti eset speciális okokra vezethető vissza, egy diagnosztikai pontosságú mutáció-analízis során valódi mutációk elvesztése nem megengedett. A variáns-szűrők által szekvenálási hibának vélt és ezért kiszelektált variánsok vizuális ellenőrzése a végleges eredmény elfogadása előtt segíthet megakadályozni Ion Torrent adatelemzés során valódi mutációk elvesztését (5. Ábra).

A *BRCA1* és *BRCA2* gének átfogó diagnosztikai folyamatának alkalmasnak kell lennie a két gént érintő nagyobb genomi átrendeződések detektálására is (gén deléció, exon deléció/duplikáció). Már korábban bizonyítást nyert, hogy a multiplex PCR reakciók alkalmasak arra, hogy segítségükkel megállapítsuk az amplifikált targetek

példányszámát az egyes amplikonok dózishányadosának meghatározásával. Ez multiplex amplikon kvantitálás (MAQ) [123] vagy rövid fluoreszcens fragment kvantitatív multiplex PCR (QMPSF) alkalmazásával egyaránt lehetséges [124]. A multiplex PCR-rel egybekötött NGS szekvenálás általi kópiaszám-meghatározás legfontosabb feltétele, hogy a fragmentek normalizált leolvasásszámai stabilak maradjanak az egyes minták között [113]. Ennek érdekében egységes módszerrel izolált, megfelelő minőségű és mennyiségű DNS-re van szükség, hogy az amplifikálás kinetikája a különböző minták között azonos legyen. Az elsősorban mutációk azonosítására fejlesztett diagnosztikai módszerünk a nagy átrendeződések kimutatása esetében is ígéretesnek bizonyul, hiszen a rendelkezésre álló tesztmintákban helyesen azonosította az exon deléciókat és duplikációkat (9. Ábra).

Az utóbbi években egyre fontosabbá vált olyan diagnosztikai módszerek fejlesztése, amelyekkel nem csak perifériás vérmintából lehet azonosítani a *BRCA* mutációkat, hanem tumormintákból is [125]. Ezt az igényt szem előtt tartva a kifejlesztett diagnosztikai módszerünket olyan DNS-mintákon is teszteltük, amelyeket ováriumtumrok FFPE (formalinnal fixált, paraffinba ágyazott) szövetmintájából izoláltak. Közismert tény, hogy a szomatikus *BRCA* mutációk gyakorisága ováriumtumrokban nem haladja meg az 5-8%-ot [61,62,126,127], azonosításuk mégis fontos abból a szempontból, hogy azok a petefészek-daganatos betegek, akik szomatikus *BRCA* mutációval rendelkeznek, ugyanúgy részesülhessenek a PARP-inhibitorokon alapuló célzott tumorterápiából, mint akik csírvonalban hordozzák azt [89]. Az elsőként vizsgált tíz tumor-DNS esetében párhuzamosan csírvonal-DNS mintát is vizsgáltunk, annak érdekében, hogy a két különböző eredetű mintából kapott eredményeket összehasonlíthassuk. A négy, tumormintában azonosított *BRCA* mutáció közül három a csírvonalban is jelen volt, következésképpen a 10 vizsgált

ováriumtumor-minta közül egy tartalmazott szomatikus mutációt (7. Táblázat). Az NT-8 mintában azonosított c.628C>T; p. Q210* egy új szomatikus *BRCA1* mutáció, amely a COSMIC adatbázisban még nem volt megtalálható. Ugyanakkor ebben a mintában sikerült nyomon követni a sporadikus *BRCA* tumorevolúció egyes lépéseit is, melyek során az egyik *BRCA1* allél a fent említett mutáció révén inaktiválódott, a másik pedig nagy átrendeződés (LOH: loss of heterozygosity) során veszett el (11. Ábra). Mindez felhívja a figyelmet arra, hogy mennyire fontos egy diagnosztikai folyamat során a *BRCA* gének mutációs státuszát a tumormintában is megvizsgálni [128].

A teljes *BRCA* diagnosztikának ideális esetben a tumorminta és a csíravonal-DNS vizsgálatát is magába kellene foglalnia [129]. A klinikai gyakorlatban viszont erre sok esetben nincs lehetőség, ilyenkor pedig csak a rendelkezésre álló FFPE tumormintából tudjuk elvégezni a *BRCA* vizsgálatot. Így történt ez annak a 25 ováriumtumor-mintának az esetében is, amelyeket az FFPE mintákon történő tesztelés második fázisában vizsgáltunk. Ebben az esetben a minták 48%-ában (12/25) találtunk a tumorevolúcióban szerepet játszó kóroki mutációt. Ez az arány jóval magasabb, mint amiről az ováriumtumoron végzett eddigi felmérések beszámolnak (20-30%) [61,126,128]. Mivel ebben az esetben nem vizsgáltuk külön a minták csíravonal státuszát, ezért az FFPE mintákban talált mutációkat a szerint osztályoztuk, hogy azok az adatbázisokban örökletes vagy szomatikus mutációkként vannak-e regisztrálva (BIC, ClinVar, COSMIC). Azt a mutációt, melyet egyik adatbázisban sem találtunk meg, szomatikus mutációnak tekintettük. Ezek alapján a 25 mintában talált összes mutáció 17%-a volt szomatikus (2/12), a mintáknak pedig 8% tartalmazott szomatikus mutációt (2/25). Ezek az arányok hasonlóak a más tanulmányok által közölt adatokhoz [62,128]. Az összességében mégis magasnak mondható mutáns arány (48%) tehát a mi esetünkben elsősorban a csíravonal-mutációk magas számának tulajdonítható (40%). Ez

egyrészt azzal magyarázható, hogy a 25 mintába olyan ováriumtumrok voltak beválogatva, melyek érzékenységet mutattak platina alapú kemoterápiára, ez pedig többek között a *BRCA* mutáns daganatokra jellemző [20,130]. Másrészt, a 25 minta vizsgálatából kapott statisztika még nem feltétlenül tekinthető elég erősnek az irodalmi adatokkal történő összehasonlításra. Ami a mutációk jellemzését illeti, a csíravonal-mutációk közül a leggyakoribb a négy mintában is jelen lévő *BRCA1 c.5263_5264insC* volt, amely irodalmi adatok alapján is a leggyakoribb örökletes *BRCA* mutációnak számít Magyarországon [28]. Ugyanezen hivatkozás alapján a második leggyakoribb mutáció a *BRCA1 c.181T>G*, amelyet mi két mintában is azonosítottunk. Szintén két mintában sikerült azonosítani a *c.9976A>T* báziscserét, mely így a leggyakoribb *BRCA2* mutáció volt a 25 ováriumtumor-mintában. Ennek a mutációnak nem ismerjük a gyakoriságát a hazai populációban, ugyanis a közelmúltig semleges hatású polimorfizmusként volt nyilván tartva az adatbázisokban és a szakirodalomban [131]. Mindössze egy-két éve kezdtek megjelenni azok a tanulmányok és felmérések, amelyek azt mutatják, hogy ez a variáns enyhe, illetve közepes mértékben növeli több rák, köztük az ovárium-daganatok kialakulásának kockázatát [132,133]. A korábban vizsgált NT-8 mintához hasonlóan, az „OV” sorozat mutáns mintáinak esetében is megfigyelhető volt, hogy a mutáns allél aránya homozigóta irányba tolódott el. Ennek magyarázata ebben az esetben is az allélvesztés (LOH) lehet, amely a *BRCA* tumorevolúció egyik fontos lépéseként a csíravonal-mutációt hordozó ováriumtumrokban is gyakori jelenség [62,134]. Ezáltal az addig heterozigóta formában jelenlévő *BRCA* kóroki mutáció hemizigótává válik, és funkcióképes *BRCA* nélkül a daganatsejtek újabb lépést tesznek a tumorigenezis folyamatában. A 12 mutáns minta közül csak négy esetben nem figyelhető meg ez a jelenség. Közülük az OV-15 mintában a tumor arány nagyon alacsony volt (2%), így ebben az esetben nem is lehetett

volna érzékelni a tumorsejtekben végbement változásokat (LOH). A másik három esetben feltételezhető, hogy a vad típusú allél inaktiválódása nem LOH, hanem más mechanizmus által (promóter-metiláció, poszttranszlációs módosítások hiánya) következett be a tumorevolúció során [53].

A tumormintákon végzett mutáció-analízis egyik kihívása az alacsony százalékban jelen levő mutáns allél nagy biztonsággal történő azonosítása. Az általunk vizsgált tumormintákban a szomatikus mutációk allélaránya 50% fölött volt, ami a csíravonal-mutációknál is könnyebben azonosíthatóvá teszi őket. Ez elsősorban annak köszönhető, hogy a vizsgált mintákban viszonylag nagy volt a tumorsejtek aránya (40-80%). A gyakorlat azonban azt mutatja, hogy nem mindig áll rendelkezésre ilyen nagy tumorsejt arányú minta a vizsgálat elvégzéséhez. Ezért egy megbízható diagnosztikai módszernek alacsonyabb tumorsejt arány esetén is képesnek kell lennie a mutáns allél azonosítására. A mutáns és vad típusú FFPE DNS keverékkel végzett kísérleteink arra utalnak, hogy a kifejlesztett *BRCA* diagnosztikai módszerünk alkalmas a heterozigótánál jóval alacsonyabb allélarányban jelen levő szomatikus mutációk azonosítására is (9. Táblázat). A várt és kapott mutáns allél arányok közötti eltérés pedig azzal magyarázható, hogy a keverék készítésénél felhasznált mutáns és vad típusú FFPE minta valószínűleg eltérő mennyiségű amplifikálható DNS-t tartalmazott, amit a minták töménységének mérésére használt módszer nem érzékelt.

Összegzésképpen elmondható, hogy a *BRCA* tumorevolúció vizsgálatára kifejlesztettünk egy olyan diagnosztikai folyamatot, amelyet csíravonal és FFPE tumor DNS mintákon is sikeresen teszteltünk és mutációk széles spektrumára nézve (SNP-k, 1-40 bázispáros deléciók, inszerciók, homopolimer mutációk) validáltunk Ion Torrent PGM és Illumina MiSeq újgenerációs szekvenáló platformon egyaránt. A módszer alkalmas a *BRCA* tumorevolúció egyes lépéseinek nyomkövetésére FFPE mintákban,

Illumina szekvenáló platform használata mellett pedig teljesíti a diagnosztikai módszerek pontosságára és megbízhatóságára vonatkozó klinikai elvárásokat is [117].

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009; 59: 225–49. doi: 10.3322/caac.20006. Available.
2. Bray F, Moller B, Møller B. Predicting the future burden of cancer. *NatRevCancer.* 2006; 6: 63–74. doi: 10.1038/nrc1781.
3. Vogelstein B, Kinzler K. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004; 10: 789–99. doi: 10.1038/nm1087.
4. Banks KC, Moline JJ, Marvin ML, Newlin AC, Vogel KJ. 10 Rare Tumors That Warrant a Genetics Referral. *Fam Cancer.* 2013; 12: 1–18. doi: 10.1007/s10689-012-9584-9.
5. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012; 481: 306–13. doi: 10.1038/nature10762.
6. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. 2012; 366: 883–92. doi: 10.1056/NEJMoa1113205. Intratumor.
7. Gao R, Davis A, McDonald TO, Sei E, Shi X, Wang Y, Tsai P-C, Casasent A, Waters J, Zhang H, Meric-Bernstam F, Michor F, Navin NE. Punctuated copy number evolution and clonal stasis in triple-negative breast cancer. *Nat Genet.* 2016; 48: 1–15. doi: 10.1038/ng.3641.
8. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz Jr. LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science (80-).* 2013; 339: 1546–58. doi: 10.1126/science.1235122.
9. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King M-C. Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science (80-).* 1990; 250: 1684–9. doi: 10.1126/science.2270482.
10. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 1995; 378: 789–92. doi: 10.1038/378789a0.
11. Joó JG. A BRCA-gének mint a családi halmozódású emlő - és petefészekrák kóroki tényezői. *Nőgyógyászati Oknkológia.* 2013; 18: 17–24.
12. Jasin M. Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene.* 2002; 21: 8981–93. doi: 10.1038/sj.onc.1206176.
13. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell.* 2002; 108: 171–82. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00615-3.
14. Moynahan ME, Cui TY, Jasin M. Homology-directed DNA repair, mitomycin-C resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res.* 2001; 61: 4842–50.

15. Sharan SK, Pyle A, Coppola V, Babus J, Swaminathan S, Benedict J, Swing D, Martin BK, Tessarollo L, Evans JP, Flaws J a, Handel MA. BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development*. 2004; 131: 131–42. doi: 10.1242/dev.00888.
16. Zámorszky J, Szikriszt B, Gervai JZ, Pipek O, Póti Á, Krzystanek M, Ribli D, Szalai-Gindl JM, Csabai I, Szallasi Z, Swanton C, Richardson AL, Szüts D. Loss of BRCA1 or BRCA2 markedly increases the rate of base substitution mutagenesis and has distinct effects on genomic deletions. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2016; : 1–10. doi: 10.1038/onc.2016.243.
17. Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature*. 2000; 408: 429–32. doi: 10.1038/35044000.
18. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2012; 12: 68–78. doi: 10.1038/nrc3181.
19. Tutt ANJ, van Oostrom CTM, Ross GM, van Steeg H, Ashworth A. Disruption of Brca2 increases the spontaneous mutation rate in vivo: Synergism with ionizing radiation. *EMBO Rep*. 2002; 3: 255–60. doi: 10.1093/embo-reports/kvf037.
20. Patel KJ, Yu VP, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Colledge WH, Friedman LS, Ponder BA, Venkitaraman AR. Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell*. 1998; 1: 347–57. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80035-0.
21. Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 11364–9. doi: 10.1073/pnas.96.20.11364.
22. Callebaut I, Mornon JP. From BRCA1 to RAP1: A widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett*. Federation of European Biochemical Societies; 1997; 400: 25–30. doi: 10.1016/S0014-5793(96)01312-9.
23. O'Donovan PJ, Livingston DM. BRCA1 and BRCA2: Breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*. 2010; 31: 961–7. doi: 10.1093/carcin/bgq069.
24. Yun MH, Hiom K. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*. Nature Publishing Group; 2009; 459: 460–3. doi: 10.1038/nature07955.
25. Polanowska J, Martin JS, Garcia-Muse T, Petalcorin MIR, Boulton SJ. A conserved pathway to activate BRCA1-dependent ubiquitylation at DNA damage sites. *EMBO J*. 2006; 25: 2178–88. doi: 10.1038/sj.emboj.7601102.
26. Ruffner H, Joazeiro CA, Hemmati D, Hunter T, Verma IM. Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 5134–9. doi: 10.1073/pnas.081068398.
27. Van Der Groep P, Van Der Wall E, Van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol*. 2011; 34: 71–88. doi: 10.1007/s13402-011-0010-3.

28. Oláh E. A BRCA1 és BRCA2 gének. *Magy Tudomány - Onkológia*. 2005; 166: 989–1001.
29. Xu B, Kim S-T, Kastan MB. Involvement of Brcal in S-phase and G 2-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 3445–50. doi: 10.1128/MCB.21.10.3445.
30. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*. 2000; 14: 927–39. doi: 10.1101/gad.14.8.927.
31. Greenberg RA, Sobhian B, Pathania S, Cantor SB, Nakatani Y, Livingston DM. Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1 / BARD1-containing complexes. *Genes Dev*. 2006; 20: 34–46. doi: 10.1101/gad.1381306.
32. Koonin E V., Altschul SF, Bork P. ...Functional motifs.... *Nat Genet*. 1996; 13: 266–8. doi: 10.1038/ng0796-266.
33. Mizuta R, LaSalle JM, Cheng HL, Shinohara A, Ogawa H, Copeland N, Jenkins NA, Lalonde M, Alt FW. RAB22 and RAB163/mouse BRCA2: proteins that specifically interact with the RAD51 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 6927–32. doi: 10.1073/pnas.94.13.6927.
34. Davies OR, Pellegrini L. UKPMC Funders Group Interaction with the BRCA2 C-terminus Protects RAD51 – DNA Filaments from Disassembly by BRC Repeats. *DNA Repair (Amst)*. 2007; 14: 475–83. doi: 10.1038/nsmb1251.Interaction.
35. Moldovan G-L, D’Andrea AD. How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet*. 2009; 43: 223–49. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134222.
36. Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H, Jasin M. Double-Strand Break Repair-Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11. *Cell*. Elsevier Inc.; 2011; 145: 529–42. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.041.
37. Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet*. 2008; 40: 17–22. doi: 10.1038/ng.2007.53.
38. Karakasis K, Burnier J V., Bowering V, Oza AM, Lheureux S. Ovarian Cancer and BRCA1/2 Testing: Opportunities to Improve Clinical Care and Disease Prevention. *Front Oncol*. 2016; 6: 119. doi: 10.3389/fonc.2016.00119.
39. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, Roeb W, Agnew KJ, Stray SM, Wickramanayake A, Norquist B, Pennington KP, Garcia RL, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 18032–7. doi: 10.1073/pnas.1115052108.
40. Foulkes WD. Inherited Susceptibility to Common Cancers. *N Engl J Med*. 2008; 359: 2143–53. doi: 10.1056/NEJMra0802968.

41. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1993; 52: 678–701.
42. Narod SA, Ford D, Devilee P, Barkardottir RB, Lynch HT, Smith SA, Ponder BA, Weber BL, Garber JE, Birch JM. An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1995; 56: 254–64.
43. Antoniou a, Pharoah PDP, Narod S, Risch H a, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg a, Pasini B, Radice P, Manoukian S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 1117–30. doi: 10.1086/375033.
44. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 1329–33. doi: 10.1200/JCO.2006.09.1066.
45. FitzGerald MG, Marsh DJ, Wahrer D, Bell D, Caron S, Shannon KE, Ishioka C, Isselbacher KJ, Garber JE, Eng C, Haber DA. Germline mutations in PTEN are an infrequent cause of genetic predisposition to breast cancer. *Oncogene.* 1998; 17: 727–31. doi: 10.1038/sj.onc.1201984.
46. Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJP, Keller JJ, Westerman AM, Scott RJ, Lim W, Trimbath JD, Giardiello FM, Gruber SB, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 3209–15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0083.
47. Schrader KA, Masciari S, Boyd N, Wiyrick S, Kaurah P, Senz J, Burke W, Lynch HT, Garber JE, Huntsman DG. Hereditary diffuse gastric cancer: Association with lobular breast cancer. *Fam Cancer.* 2008; 7: 73–82. doi: 10.1007/s10689-007-9172-6.
48. Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, Han JH, Lowstuter K, Longmate J, Sommer SS, Weitzel JN. Beyond li fraumeni syndrome: Clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 1250–6. doi: 10.1200/JCO.2008.16.6959.
49. Walsh T, Lee MK, Casadei S, Thornton AM, Stray SM, Pennil C, Nord AS, Mandell JB, Swisher EM, King M-C. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 12629–33. doi: 10.1073/pnas.1007983107.
50. Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. *Science (80-).* 2014; 343: 1466–70. doi: 10.1126/science.1251827.
51. Kanchi KL, Johnson KJ, Lu C, McLellan MD, Leiserson MDM, Wendl MC, Zhang Q, Koboldt DC, Xie M, Kandoth C, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Larson DE, et al. Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nat Commun.* 2014; 5: 3156. doi: 10.1038/ncomms4156.

52. Melchor L, Benítez J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Hum Genet.* 2013; 132: 845–63. doi: 10.1007/s00439-013-1299-y.
53. Welch PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet.* 2001; 10: 705–13. doi: 10.1093/hmg/10.7.705.
54. Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, Sulik KK, Koller BH. Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet.* 1996; 12: 191–4. doi: 10.1038/ng0296-191.
55. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971; 68: 820–3. doi: 10.1073/pnas.68.4.820.
56. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, Mceuen M, Taylor M, Hood L, King M-C. Complete Genomic Sequence and Analysis of 117 kb of Human DNA Containing the Gene BRCA1. *Genome Res.* 1996; 6: 1029–49. doi: 10.1101/gr.6.11.1029.
57. Nordling M, Karlsson P, Wahlström J, Nordling M, Wahlstrå J, Engwall Y, Wallgren A, Martinsson T. A Large Deletion Disrupts the Exon 3 Transcription Activation Domain of the BRCA2 Gene in a Breast / Ovarian Cancer Family. *Advances in Brief A Large Deletion Disrupts the Exon 3 Transcription Activation Domain of the BRCA2 Gene in a Breast / Ovarian Cance.* 1998; : 1372–5.
58. Unger MA, Nathanson KL, Calzone K, Antin-Ozerkis D, Shih HA, Martin A-M, Lenoir GM, Mazoyer S, L. Weber B. Screening for Genomic Rearrangements in Families with Breast and Ovarian Cancer Identifies BRCA1 Mutations Previously Missed by Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis or Sequencing. *Am J Hum Genet.* 2000; 67: 841–50. doi: 10.1086/303076.
59. Martins FC, De S, Almendro V, Gönen M, Park SY, Blum JL, Herlihy W, Ethington G, Schnitt SJ, Tung N, Garber JE, Fettes K, Michor F, et al. Evolutionary pathways in BRCA1-associated breast tumors. *Cancer Discov.* 2012; 2: 503–11. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0325.
60. Goggins M, Hruban RH, Kern SE. BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol.* 2000; 156: 1767–71. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65047-X.
61. Bell D, Berchuck A, Birrer M, Chien J, Cramer DW, Dao F, Dhir R, DiSaia P, Gabra H, Glenn P, Godwin AK, Gross J, Hartmann L, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011; 474: 609–15. doi: 10.1038/nature10166.
62. Kanchi KL, Johnson KJ, Lu C, McLellan MD, Leiserson MDM, Wendl MC, Zhang Q, Koboldt DC, Xie M, Kandoth C, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Larson DE, et al. Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nat Commun. Nature Publishing Group;* 2014; 5: 3156. doi: 10.1038/ncomms4156.
63. Winter C, Nilsson MP, Olsson E, George AM, Chen Y, Kvist A, Törngren T, Vallon-Christersson J, Hegardt C, Hakkinen J, Jönsson G, Grabau D, Malmberg

- M, et al. Targeted sequencing of BRCA1 and BRCA2 across a large unselected breast cancer cohort suggests that one-third of mutations are somatic. *Ann Oncol.* 2016; 27: 1532–8. doi: 10.1093/annonc/mdw209.
64. Staples J. and Goodman A. PARP Inhibitors in Ovarian Cancer. In: Iván Díaz-Padilla, editor. *Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update.* InTech; 2013. p. 303–25. doi: 10.5772/56234.
 65. Cavalli LR, Singh B, Isaacs C, Dickson RB, Haddad BR. Loss of heterozygosity in normal breast epithelial tissue and benign breast lesions in BRCA1/2 carriers with breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004; 149: 38–43. doi: 10.1016/S0165-4608(03)00282-6.
 66. Szabo C, Masiello A, Ryan JF, Brody LC. The breast cancer information core: database design, structure, and scope. *Hum Mutat.* 2000; 16: 123–31. doi: 10.1002/1098-1004(200008)16:2<123::AID-HUMU4>3.0.CO;2-Y.
 67. Szabo, C I.; Worley, Terri; Monteiro AN. Understanding Germ-Line Mutations in BRCA1. *Cancer Biol Ther.* 2004; : 515–20.
 68. Millot GA, Carvalho MA, Caputo SM, Vreeswijk MPG, Brown MA, Webb M, Rouleau E, Neuhausen SL, Hansen TVO, Galli A, Brandão RD, Blok MJ, Velkova A, et al. A guide for functional analysis of BRCA1 variants of uncertain significance. *Hum Mutat.* 2012; 33: 1526–37. doi: 10.1002/humu.22150.
 69. Ramus SJ, Kote-Jarai Z, Friedman LS, van der Looij M, Gayther SA, Csokay B, Ponder BA, Olah E. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Hungarian families with breast or breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet.* 1997; 60: 1242–6.
 70. Van Der Looij M, Szabo C, Besznyak I, Liszka G, Csokay B, Pulay T, Toth J, Devilee P, King MC, Olah E. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary. *Int J Cancer.* 2000; 86: 737–40.
 71. Hansen TVO, Jønson L, Albrechtsen A, Andersen MK, Ejlersen B, Nielsen FC. Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 115: 315–23. doi: 10.1007/s10549-008-0088-0.
 72. Sluiter MD, Van Rensburg EJ. Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: Review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 125: 325–49. doi: 10.1007/s10549-010-0817-z.
 73. Augustyn AM, Agostino NM, Namey TL, Nair S, Martino MA. Two patients with germline mutations in both BRCA1 and BRCA2 discovered unintentionally: A case series and discussion of BRCA testing modalities. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 129: 629–34. doi: 10.1007/s10549-011-1597-9.
 74. Ramus SJ, Friedman LS, Gayther S a, Ponder B a, Bobrow L, van der Looji M, Papp J, Olah E. A breast/ovarian cancer patient with germline mutations in both BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet.* 1997; 15: 14–5. doi: 10.1038/ng0197-14.
 75. Hartge P, Struewing JP, Wacholder S, Brody LC, Tucker MA. The prevalence of

- common BRCA1 and BRCA2 mutations among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 963–70. doi: 10.1086/302320.
76. Lavie O, Narod S, Lejbkowitz F, Dishon S, Goldberg Y, Gemer O, Rennert G. Double heterozygosity in the BRCA1 and BRCA2 genes in the Jewish population. 2011; : 964–6. doi: 10.1093/annonc/mdq460.
 77. Degrolard-Courcet E, Sokolowska J, Padeano M-M, Guiu S, Bronner M, Chery C, Coron F, Lepage C, Chapusot C, Loustalot C, Jouve J-L, Hatem C, Ferrant E, et al. Development of primary early-onset colorectal cancers due to biallelic mutations of the FANCD1/BRCA2 gene. *Eur J Hum Genet.* 2013; : 979–87. doi: 10.1038/ejhg.2013.278.
 78. Meyer S, Tischkowitz M, Chandler K, Gillespie A, Birch JM, Evans DG. Fanconi anaemia, BRCA2 mutations and childhood cancer: a developmental perspective from clinical and epidemiological observations with implications for genetic counselling. *J Med Genet.* 2014; 51: 71–5. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-101642.
 79. Domchek SM, Tang J, Stopfer J, Lilli DR, Hamel N, Tischkowitz M, Monteiro ANA, Messick TE, Powers J, Yonker A, Couch FJ, Goldgar DE, Rosemarie Davidson H, et al. Biallelic deleterious BRCA1 mutations in a woman with early-onset ovarian cancer. *Cancer Discov.* 2013; 3: 399–405. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0421.
 80. Berliner JL, Fay AM. Risk assessment and genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 2007; 16: 241–60. doi: 10.1007/s10897-007-9090-7.
 81. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* (80-). 2003; 302: 643–6. doi: 10.1126/science.1088759.
 82. Hartmann LC1, Schaid DJ, Woods JE, Crotty TP, Myers JL, Arnold PG, Petty PM, Sellers TA, Johnson JL, McDonnell SK, Frost MH JR. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *N Engl J Med.* 1999; 340: 77–84.
 83. Nichols HB, Visvanathan K, Newcomb PA, Hampton JM, Egan KM, Titus-Ernstoff L, Trentham-Dietz A. Bilateral oophorectomy in relation to risk of postmenopausal breast cancer: Confounding by nonmalignant indications for surgery? *Am J Epidemiol.* 2011; 173: 1111–20. doi: 10.1093/aje/kwq510.
 84. Amé JC, Spenlehauer C, De Murcia G. The PARP superfamily. *BioEssays.* 2004; 26: 882–93. doi: 10.1002/bies.20085.
 85. De Vos M, Schreiber V, Dantzer F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: Current state of the art. *Biochem Pharmacol.* 2012; 84: 137–46. doi: 10.1016/j.bcp.2012.03.018.
 86. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature.* 2005; 434: 913–7. doi:

10.1038/nature03443.

87. Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, Poole C, Mathijssen RHJ, Sonke GS, Colombo N, Špaček J, Vuylsteke P, Hirte H, Mahner S, Plante M, Schmalfeldt B, et al. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: A randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015; 16: 87–97. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71135-0.
88. Deeks ED. Olaparib: First Global Approval. *Drugs.* 2015; 75: 1815–22. doi: 10.1007/s40265-015-0474-y.
89. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott CL, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Fielding A, Spencer S, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15: 852–61. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70228-1.
90. Livraghi L, Garber JE. PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC Med. BMC Medicine;* 2015; 13: 188. doi: 10.1186/s12916-015-0425-1.
91. Gerhardus A, Schleberger H, Schlegelberger B, Gadzicki D. Diagnostic accuracy of methods for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations: a systematic review. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15: 619–27. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201806.
92. Tafe LJ, Datto MB, Palomaki GE, Lachawan FL. Molecular testing for the BRCA1 and BRCA2 Ashkenazi Jewish founder mutations: a report on the College of American Pathologists proficiency testing surveys. *Genet Med.* 2015; 17: 58–62. doi: 10.1038/gim.2014.77.
93. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; 74: 5463–7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
94. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, Murphy KM. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn. American Society for Investigative Pathology and Association for Molecular Pathology;* 2010; 12: 425–32. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090188.
95. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: e57. doi: 10.1093/nar/gnf056.
96. Luo JD, Chan EC, Shih CL, Chen TL, Liang Y, Hwang TL, Chiou CC. Detection of rare mutant K-ras DNA in a single-tube reaction using peptide nucleic acid as both PCR clamp and sensor probe. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34: 1–7. doi: 10.1093/nar/gnj008.
97. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J,

- Braverman MS, Chen Y, Chen Z, Dewell B, Du L, Fierro JM, et al. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nat Biotechnol.* 2006; 437: 376–80. doi: 10.1038/nature03959. Copyright.
98. Rokas A, Abbot P. Harnessing genomics for evolutionary insights. *Trends Ecol Evol.* 2009; 24: 192–200. doi: 10.1016/j.tree.2008.11.004.
 99. Morgan JE, Carr IM, Sheridan E, Chu CE, Hayward B, Camm N, Lindsay HA, Mattocks CJ, Markham AF, Bonthron DT, Taylor GR. Genetic diagnosis of familial breast cancer using clonal sequencing. *Hum Mutat.* 2010; 31: 484–91. doi: 10.1002/humu.21216.
 100. De Leeneer K, Hellemans J, De Schrijver J, Baetens M, Poppe B, Van Criekinge W, De Paepe A, Coucke P, Claes K. Massive parallel amplicon sequencing of the breast cancer genes BRCA1 and BRCA2: Opportunities, challenges, and limitations. *Hum Mutat.* 2011; 32: 335–44. doi: 10.1002/humu.21428.
 101. Ozelik H, Shi X, Chang MC, Tram E, Vlasschaert M, Di Nicola N, Kiselova A, Yee D, Goldman A, Dowar M, Sukhu B, Kandel R, Siminovitch K. Long-range PCR and next-generation sequencing of BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *J Mol Diagnostics.* Elsevier Inc.; 2012; 14: 467–75. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.03.006.
 102. Tarabeux J, Zeitouni B, Moncoutier V, Tenreiro H, Abidallah K, Lair S, Legoix-Né P, Leroy Q, Rouleau E, Golmard L, Barillot E, Stern M-H, Rio-Frio T, et al. Streamlined ion torrent PGM-based diagnostics: BRCA1 and BRCA2 genes as a model. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22: 535–41. doi: 10.1038/ejhg.2013.181.
 103. Strom CM, Rivera S, Elzinga C, Angeloni T, Rosenthal SH, Goos-Root D, Siaw M, Platt J, Braastadt C, Cheng L, Ross D, Sun W. Development and validation of a next-generation sequencing assay for BRCA1 and BRCA2 variants for the clinical laboratory. *PLoS One.* 2015; 10: 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0136419.
 104. Kapp JR, Diss T, Spicer J, Gandy M, Schrijver I, Jennings LJ, Li MM, Tsongalis GJ, de Castro DG, Bridge JA, Wallace A, Deignan JL, Hing S, et al. Variation in pre-PCR processing of FFPE samples leads to discrepancies in BRAF and EGFR mutation detection: a diagnostic RING trial. *J Clin Pathol.* 2015; 68: 111–8. doi: 10.1136/jclinpath-2014-202644.
 105. Rait V. K. , Zhang Q., Fabris D., Mason J. T., O’Leary TJ. Conversions of Formaldehyde-modified 2'-Deoxyadenosine 5'- Monophosphate in Conditions Modeling Formalin-fixed Tissue Dehydration. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54: 301–10. doi: 10.1038/jid.2014.371.
 106. Wang M, Escudero-Ibarz L, Moody S, Zeng N, Clipson A, Huang Y, Xue X, Grigoropoulos NF, Barrans S, Worrillow L, Forsheew T, Su J, Firth A, et al. Somatic Mutation Screening Using Archival Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues by Fluidigm Multiplex PCR and Illumina Sequencing. *J Mol Diagn. American Society for Investigative Pathology and the Association for Molecular Pathology;* 2015; 17: 521–32. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.04.008.
 107. Weren RDA, Mensenkamp AR, Simons M, Eijkelenboom A, Sie AS, Ouchene

- H, van Asseldonk M, Gomez-Garcia EB, Blok MJ, de Hullu JA, Nelen MR, Hoischen A, Bulten J, et al. Novel BRCA1 and BRCA2 Tumour Test as Basis for Treatment Decisions and Referral for Genetic Counselling of Patients with Ovarian Carcinomas. *Hum Mutat.* 2016; : 1–10. doi: 10.1002/humu.23137.
108. Badoer C, Garrec C, Goossens D, Ellison G, Mills J, Dzial M, El Housni H, Berwouts S, Concolino P, Guevellou VG-L, Delnatte C, Favero J Del, Capoluongo E, et al. Performance of multiplicom's BRCA MASTR Dx kit on the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in fresh frozen ovarian and breast tumor samples. *Oncotarget.* 2016; 5: 81357–66. doi: 10.18632/oncotarget.12877.
 109. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000; 132: 365–86.
 110. Burrows M, Wheeler D. A block-sorting lossless data compression algorithm. *Algorithm, Data Compression.* 1994; : 18. doi: 10.1.1.37.6774.
 111. Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol.* 1981; 147: 195–7. doi: 10.1016/0022-2836(81)90087-5.
 112. Mann HB, Whitney DR. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann Math Stat. Institute of Mathematical Statistics;* 1947; 18: 50–60.
 113. Goossens D, Moens LN, Nelis E, Lenaerts AS, Glassee W, Kalbe A, Frey B, Kopal G, De Jonghe P, De Rijk P, Del-Favero J. Simultaneous mutation and copy number variation (CNV) detection by multiplex PCR-based GS-FLX sequencing. *Hum Mutat.* 2009; 30: 472–6. doi: 10.1002/humu.20873.
 114. Loman NJ, Misra R V, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, Pallen MJ. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol.* 2012; 30: 434–9. doi: 10.1038/nbt.2198.
 115. Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 4494–9. doi: 10.1073/pnas.96.8.4494.
 116. Binder V, Bartenhagen C, Okpanyi V, Gombert M, Moehlendick B, Behrens B, Klein HU, Rieder H, Ida Krell PF, Dugas M, Stoecklein NH, Borkhardt A. A New Workflow for Whole-Genome Sequencing of Single Human Cells. *Hum Mutat.* 2014; 35: 1260–70. doi: 10.1002/humu.22625.
 117. Enyedi MZ, Jaksa G, Pintér L, Sükösd F, Gyuris Z, Hajdu A, Határvölgyi E, Priskin K, Haracska L. Simultaneous detection of BRCA mutations and large genomic rearrangements in germline DNA and FFPE tumor samples. *Oncotarget.* 2014; 7. doi: 10.18632/oncotarget.11259.
 118. Bosdet IE, Docking TR, Butterfield YS, Mungall AJ, Zeng T, Coope RJ, Yorida E, Chow K, Bala M, Young SS, Hirst M, Birol I, Moore RA, et al. A clinically validated diagnostic second-generation sequencing assay for detection of hereditary BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Mol Diagnostics.* 2013; 15: 796–809. doi: 10.1016/j.jmoldx.2013.07.004.

119. Costa JL, Sousa S, Justino A, Kay T, Fernandes S, Cirnes L, Schmitt F, Machado JC. Nonoptical Massive Parallel DNA Sequencing of BRCA1 and BRCA2 Genes in a Diagnostic Setting. *Hum Mutat.* 2013; 34: 629–35. doi: 10.1002/humu.22272.
120. Feliubadaló L, Lopez-Doriga A, Castellsagué E, del Valle J, Menéndez M, Tornero E, Montes E, Cuesta R, Gómez C, Campos O, Pineda M, González S, Moreno V, et al. Next-generation sequencing meets genetic diagnostics: development of a comprehensive workflow for the analysis of BRCA1 and BRCA2 genes. *Eur J Hum Genet.* 2013; 21: 864–70. doi: 10.1038/ejhg.2012.270.
121. Albers CA, Lunter G, MacArthur DG, McVean G, Ouwehand WH, Durbin R. Dindel: Accurate indel calls from short-read data. *Genome Res.* 2011; 21: 961–73. doi: 10.1101/gr.112326.110.
122. Yeo ZX, Chan M, Yap YS, Ang P, Rozen S, Lee ASG. Improving Indel Detection Specificity of the Ion Torrent PGM Benchtop Sequencer. *PLoS One.* 2012; 7. doi: 10.1371/journal.pone.0045798.
123. Slegers K, Brouwers N, Gijssels I, Theuns J, Goossens D, Wauters J, Del-Favero J, Cruts M, van Duijn CM, Van Broeckhoven C. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain.* 2006; 129: 2977–83. doi: 10.1093/brain/awl203.
124. Casilli F, Di Rocco ZC, Gad S, Tournier I, Stoppa-Lyonnet D, Frebourg T, Tosi M. Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum Mutat.* 2002; 20: 218–26. doi: 10.1002/humu.10108.
125. Endris V, Stenzinger A, Pfarr N, Penzel R, Möbs M, Lenze D, Darb-Esfahani S, Hummel M, Sabine-Merkelbach-Bruse, Jung A, Lehmann U, Kreipe H, Kirchner T, et al. NGS-based BRCA1/2 mutation testing of high-grade serous ovarian cancer tissue: results and conclusions of the first international round robin trial. *Virchows Arch.* 2016; . doi: 10.1007/s00428-016-1919-8.
126. Hennessy BTJ, Timms KM, Carey MS, Gutin A, Meyer LA, Flake DD, Abkevich V, Potter J, Pruss D, Glenn P, Li Y, Li J, Gonzalez-Angulo AM, et al. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 3570–6. doi: 10.1200/JCO.2009.27.2997.
127. Mafficini A, Simbolo M, Parisi A, Rusev B, Luchini C, Cataldo I, Piazzola E, Sperandio N, Turri G, Franchi M, Tortora G, Bovo C, Lawlor RT, et al. BRCA somatic and germline mutation detection in paraffin embedded ovarian cancers by next-generation sequencing. *Oncotarget.* 2016; 7: 1076–83. doi: 10.18632/oncotarget.6834.
128. Magdalena K, Monika Z, Adam G, Magdalena R, Marzena L, Wojciech B, Janusz L, Bartosz W. Detection of somatic BRCA1/2 mutations in ovarian cancer - next-generation sequencing analysis of 100 cases. *Cancer Med.* 2016; : 1–7. doi: 10.1002/cam4.748.
129. Ellison G, Huang S, Carr H, Wallace A, Ahdesmaki M, Bhaskar S, Mills J. A

- reliable method for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in fixed tumour tissue utilising multiplex PCR-based targeted next generation sequencing. *BMC Clin Pathol.* 2015; 15: 5. doi: 10.1186/s12907-015-0004-6.
130. Yang D, Khan S, Sun Y, Hess K, Shmulevich I, Sood AK, Zhang W. Association of BRCA1 and BRCA2 mutations with survival, chemotherapy sensitivity, and gene mutator phenotype in patients with ovarian cancer. *Jama.* 2011; 306: 1557–65. doi: 10.1001/jama.2011.1456.
 131. Mazoyer S, Dunning AM, Serova O, Dearden J, Puget N, Healey CS, Gayther SA, Mangion J, Stratton MR, Lynch HT, Goldgar DE, Ponder BA, Lenoir GM. A polymorphic stop codon in BRCA2. *Nat Genet.* 1996; 14: 253–4. doi: 10.1038/ng1196-253.
 132. Thompson ER, Goringe KL, Rowley SM, Li N, McInerney S, Wong-Brown MW, Devereux L, Li J, Lifepool Investigators, Trainer AH, Mitchell G, Scott RJ, James PA, et al. Reevaluation of the BRCA2 truncating allele c.9976A > T (p.Lys3326Ter) in a familial breast cancer context. *Sci Rep.* 2015; 5: 14800. doi: 10.1038/srep14800.
 133. Meeks HD, Song H, Michailidou K, Bolla MK, Dennis J, Wang Q, Barrowdale D, Frost D, McGuffog L, Ellis S, Feng B, Buys SS, Hopper JL, et al. BRCA2 Polymorphic Stop Codon K3326X and the Risk of Breast, Prostate, and Ovarian Cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2016; 108: 1–10. doi: 10.1093/jnci/djv315.
 134. Uehara Y, Oda K, Ikeda Y, Koso T, Tsuji S, Yamamoto S, Asada K, Sone K, Kurikawa R, Makii C, Hagiwara O, Tanikawa M, Maeda D, et al. Integrated copy number and expression analysis identifies profiles of whole-arm chromosomal alterations and subgroups with favorable outcome in ovarian clear cell carcinomas. *PLoS One.* 2015; 10: 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0128066.

8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Mórocz M, Zsigmond E, Tóth R, **Enyedi MZ**, Pintér L, Haracska L. DNA-dependent protease activity of human Spartan facilitates replication of DNA–protein crosslink-containing DNA. *Nucleic Acids Res.* 2017; gkw1315. doi: 10.1093/nar/gkw1315. IF (2015-2016): 9,202

Enyedi MZ, Jaksa G, Pintér L, Sükösd F, Gyuris Z, Hajdu A, Határvölgyi E, Priskin K, Haracska L. Simultaneous detection of *BRCA* mutations and large genomic rearrangements in germline DNA and FFPE tumor samples. *Oncotarget.* 2016. doi: 10.18632/oncotarget, IF (2014): 6,35

E. Ruprecht, **M. Z. Enyedi**, A. Szabó, A. Fenesi.: Biomass removal by clipping and raking vs burning for the restoration of abandoned *Stipa*-dominated European steppe-like grassland. *Applied Vegetation Science.* 2015. DOI: 10.1111/avsc.12199. IF (2015): 2,30

E. Ruprecht, **M. Z. Enyedi**, R. L. Eckstein, T. W. Donath: Restorative removal of plant litter and vegetation 40 years after abandonment enhances re-emergence of steppe grassland vegetation. *Biological Conservation.* 2010. 143: 449-456. IF (2010): 4,29

E. Ruprecht, A. Szabó, **M. Z. Enyedi** & J. Dengler: Steppe-like grasslands in Transylvania (Romania): characterization and influence of management on species diversity and composition. *Tuexenia.* 2009. 29: 353-368.

Enyedi, M.-Zs., Ruprecht, E. & Deák, M: Long-term effects of the abandonment of grazing on steppe-like grasslands. *Applied Vegetation Science.* 2008. 11: 53-60. IF (2008): 1,30

Kéziratok:

Cs. Brasko, K. Smith, Cs. Molnar, L. Hegedus, A. Balind, N. Farago, L. Paavolainen, T. Balassa, A. Szkalicity, F. Sukosd, B. Balint, **M. Z. Enyedi**, I. Nagy, L. G. Puskas, L. Haracska, G. Tamas, & P. Horvath. Intelligent image-based in situ single-cell isolation. *Beküldve.*

Összes IF: 23,442

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A rák genetikai eredetű betegség, melynél a sejtek átalakulásáért és elburjánzásáért elsősorban a genetikai állományban végbemenő változások tehetők felelőssé. Ezt a folyamatot gyakran hasonlítják a darwini evolúciós modellhez, miszerint a sejt DNS-ében fokozatosan, lépésről-lépésre következnek be a genetikai elváltozások, melyeknek köszönhetően az érintett sejtek szelektív előnyökre tesznek szert a környezetükben lévő többi sejtekhez képest. Az emlő- és petefészek-daganatok kialakulása során egy ilyen fontos evolúciós lépésnek tekintik a *BRCA1* és *BRCA2* tumorszuppresszor gének inaktiválódását. Ez azzal magyarázható, hogy a *BRCA* gének által kódolt fehérjéknek kulcsszerepe van a genomstabilitás megőrzésében, melyet több szerepük révén is biztosítanak. Ezek közül a legfontosabb a homológ rekombinációban (HR) való részvételük, ami a DNS-kettős szálú törések hibamentes kijavításának fontos útvonala. Ha azonban a *BRCA* gének inaktiválódnak, a sejtekben nem lesz működőképes *BRCA1* vagy *BRCA2* fehérje, a HR folyamata és a hozzá kapcsolódó egyéb DNS-hibajavítási útvonalak zavart szenvednek, a DNS-hibák felhalmozódnak és a sejtek újabb lépést tesznek a daganatképződés irányába. A *BRCA* génekhez köthető tumorigenezisnek megkülönböztetjük örökletes és sporadikus változatát. Örökletes *BRCA* tumorevolúcióról abban az esetben beszélünk, ha az egyik *BRCA* allél csíravonal-mutációt hordoz, míg a másik allél helyileg, a tumorban inaktiválódik a tumorképződés egy későbbi szakaszában. Ezzel szemben sporadikus *BRCA* tumorigenezis során mindkét allél szomatikus úton inaktiválódik. Az örökletes *BRCA* mutációk előfordulási aránya emlő- és/vagy petefészek-daganatok esetében 10-20%, míg a szomatikus mutációk gyakorisága 5-10% között változik. Tekintettel arra, hogy egy örökletes *BRCA* mutáció akár 90%-kal is megnövelheti a tumor kialakulásának kockázatát, továbbá, mind szomatikus mind örökletes *BRCA* mutáns ovárium daganatok

esetében lehetőség van hatékony, személyre szabott tumorterápia alkalmazására, a mutációk időben történő azonosításának kiemelt egészségügyi jelentősége van. Amennyiben a genetikai tesztek valakinél igazolják a *BRCA1-2* mutációt hordozó státuszt, különböző fokozatú megelőző lépések foganatosítására van lehetőség, melyek egyöntetűen arra irányulnak, hogy a daganat kialakulását megelőzzék, a korai felismerést elősegítsék és a daganatterápiás eljárások hatékonyságát növeljék.

A *BRCA1-2* gének mutációinak szűrésére már az 1990-es évek elején történt felfedezésük után nagy igény mutatkozott. Az évek során különböző módszerek váltották egymást, melyek közül a legmegbízhatóbbnak a Sanger szekvenálást tartják. Mivel a *BRCA* gének viszonylag nagyméretűek és a bennük előforduló mutációk a génen belül bárhol lehetnek, a Sanger szekvenálás igencsak költséges és időigényes diagnosztikai eljárást eredményez. Az asztali méretű újgenerációs szekvenáló platformok elterjedésével azonban lehetőség nyílt arra, hogy a *BRCA1-2* mutáció-detektálási folyamatokat ezekre a berendezésekre helyezzük át, megnövelve ezáltal a módszer áteresztőképességét és érzékenységét, ami lehetővé teszi a mutációk tumormintából történő azonosítását akkor is, ha a mintában lévő tumorsejtek aránya alacsony. Mindez elsődleges fontosságú ahhoz, hogy a *BRCA* tumorigenezis folyamatát megismerjük, illetve annak kimenetelét befolyásolni tudjuk. Doktori munkám során ezért egy olyan komplex *BRCA* diagnosztikai eljárás kidolgozását tűztem ki célul, amely a gének multiplex PCR alapú amplifikálását, újgenerációs szekvenálását és a kimenő adatok bioinformatikai elemzését integrálja annak érdekében, hogy megbízható módszert nyújtson az örökletes és sporadikus *BRCA* inaktiválódás kimutatására.

A diagnosztikai módszer fejlesztése során a *BRCA1* és *BRCA2* gének kódoló exonjait, valamint az exon-intron határokat 80 PCR termék formájában amplifikáltam, amelyek összesen 9 multiplex PCR reakcióba voltak szétosztva. Az amplikonokat

restrikciós enzimek segítségével fragmentáltam, majd a keletkező fragmentekhez szekvenátor-specifikus adapter szekvenciákat ligáltam. Az így kapott terméket fragmentkönyvtárnak nevezzük, amely megfelelő méretszelekciót és kvantitálást követően alkalmas Illumina vagy Ion Torrent platformon történő szekvenálásra. A mintaelőkészítés lépéseinek optimalizálásával párhuzamosan egy újgenerációs szekvenálás-adatelemző szoftver fejlesztésében is részt vettem. Ez a szoftver az általános adatelemzési lépések mellett (szétválogatás, illesztés, variánskeresés, stb.), olyan algoritmusokat is tartalmaz, amelyek kifejezetten az Ion Torrent szekvenálási kémiából adódó hibák kiküszöbölését szolgálják. A diagnosztikai módszer kidolgozása során két mintacsoportot használtam: teszt- és validációs csoport. Mindkét csoport olyan mintákat tartalmazott, amelyek valamilyen örökletes mutációt hordoznak a *BRCA1* vagy *BRCA2* génben. A tesztcsoportba tartozó 24 mintát használtam a mintaelőkészítés lépéseinek optimalizálására, valamint az NGSeXplorer paramétereinek beállítására, különös tekintettel az Ion Torrent szekvenálási hibák kiküszöbölésére szolgáló szűrő-algoritmusokra. A mintaelőkészítés és adatelemzés optimalizálásának köszönhetően sikerült a szekvenálások során a megfelelő lefedettségű értékeket elérni, a variáns elemzés pedig helyesen azonosította a mutációkat valamennyi minta esetében. Ezután következett a kidolgozott diagnosztikai eljárás validálása. A húsz mintából álló validációs csoport szintén *BRCA1* vagy *BRCA2* mutáns mintákat tartalmazott, de ezúttal a mutációk pontos helye és szekvenciája a validálást végző személy előtt ismeretlen volt. A DNS-mintákból készített fragmentkönyvtárakat Illumina MiSeq és Ion Torrent PGM platformokon is megszekvenáltam, összehasonlítva a molekuláris diagnosztikában jelenleg leggyakrabban használt két szekvenáló berendezésen kapott eredményeket. Az összehasonlításból kiderült, hogy az Illumina MiSeq helyesen azonosította a kóroki mutációt mind a 20 mintában fals pozitív találat nélkül. Az Ion Torrent esetében a

variáns-szűrő algoritmusok ugyan segítettek megszabadulni a fals pozitív találatok 97,3%-ától, azonban egy esetben a valódi mutációt is szekvenálási hibának minősítették, ami a diagnosztikai érzékenységet csökkente (95%).

A *BRCA1* és *BRCA2* gének átfogó diagnosztikai folyamatának alkalmasnak kell lennie a két gént érintő nagyobb átrendeződések detektálására is. Ezért teszteltem az általam fejlesztett módszer alkalmasságát exon deléciók és duplikációk kimutatására. Erre a célra két tesztminta állt rendelkezésre, amelyekben megfelelően sikerült azonosítani az MLPA módszerrel előzőleg kimutatott átrendeződéseket.

Az utóbbi években egyre fontosabbá vált olyan módszerek fejlesztése, amelyekkel nem csak csírvonalban lehet azonosítani a *BRCA* mutációkat, hanem tumormintákból is. Ezt az igényt szem előtt tartva a kifejlesztett diagnosztikai módszert olyan DNS-mintákon is teszteltem, amelyeket ováriumtumork FFPE szövetmintájából izoláltak. Az elsőként megvizsgált tíz betegmintából négyben azonosítottunk mutációt, amelyek közül három örökletes volt, egy pedig sporadikus. Ez utóbbi egy új *BRCA1* mutáció volt (c.628C>T; p. Q210*), melyet eddig még egyetlen adatbázisban sem regisztráltak. Ugyanakkor ebben a mintában sikerült nyomon követni a sporadikus *BRCA* tumorevolúció egyes lépéseit is, melyek során az egyik *BRCA1* allél a fent említett mutáció révén inaktiválódott, a másik pedig nagy átrendeződés során veszett el (LOH: loss of heterozygosity). Ezt követően újabb 25 ováriumtumor-minta *BRCA* mutációs státuszát vizsgáltam meg. A minták közel felében sikerült azonosítani daganatképződéssel összefüggést mutató elváltozást. Ezeknek a mutációknak a nagy része örökletes volt, kettőről azonban feltételezhetjük, hogy csak a daganatban volt jelen. A mutáns allél aránya az esetek többségében homozigóta irányba tolódott el, ami arra utal, hogy a vad típusú allél ezekben a tumorokban is LOH által inaktiválódott.

Mindez felhívja a figyelmet arra, hogy mennyire fontos a diagnosztikai folyamat során a *BRCA* gének mutációs státuszát a tumormintában is megvizsgálni.

Összegzésképpen elmondható, hogy a *BRCA* mutációk azonosítására kifejlesztettünk egy olyan diagnosztikai folyamatot, amelyet csírvonal és FFPE tumor DNS mintákon is sikeresen teszteltünk és mutációk széles spektrumára nézve validáltunk Ion Torrent PGM és Illumina MiSeq újgenerációs szekvenáló platformon egyaránt. A módszer alkalmas a *BRCA* tumorevolúció egyes lépéseinek nyomonkövetésére FFPE mintákban, Illumina szekvenáló platform használata mellett pedig teljesíti a diagnosztikai módszerek pontosságára és megbízhatóságára vonatkozó klinikai elvárásokat is.

10. SUMMARY

Cancer is a genetic disease in which changes in the genetic material are responsible for the transformation and clonal expansion of the cells. This process is often compared to the Darwinian evolutionary model, where changes in the genetic material occur gradually, offering selective advantages for the affected cells compared to the others. Inactivation of the tumour suppressor genes *BRCA1* and *BRCA2* is considered to be such a gradual evolutionary step during the development of breast and ovarian cancer. This is due to the crucial role of BRCA proteins in the maintenance of genome integrity achieved by multiple mechanisms. Most importantly, they play a key role in homologous recombination, which is one of the most important repair mechanisms for DNA double-strand breaks. Mutations in the *BRCA* genes lead to the inactivation of the BRCA proteins resulting in defective homologous recombination and also affecting other DNA repair mechanisms of the cell. Consequently, DNA damage will accumulate in time, and cells proceed towards tumorigenesis. We can distinguish between a hereditary and a sporadic form of *BRCA*-related tumorigenesis. In the case of inherited *BRCA* tumorigenesis, one allele of the gene has a germline-inactivating mutation. The remaining allele will be inactivated locally in the tumour cells by somatic alterations in a later phase of the tumour evolution. In the case of somatic *BRCA* tumorigenesis, both alleles are inactivated through somatic events. The presence of germline *BRCA* mutations can be observed only in a minor fraction of all breast and ovarian cancer patients. However, due to the fact that these mutations can increase the risk of developing breast and/or ovarian cancer by 90%, the identification of germline *BRCA* mutations is a crucial healthcare issue. If a genetic test confirms that an individual is carrying a *BRCA1-2* mutation, there are several possibilities to prevent the

development of cancer, to promote early detection, and to increase the efficiency of cancer therapy.

Regarding all the above mentioned, it is comprehensible that the need for a reliable genetic test for the detection of mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes emerged soon after their discovery in the early 90s. Since then, different methods have been used for mutation diagnostics, among which the Sanger sequencing method proved to be the best. However, due to the lack of mutational hotspots in the *BRCA* genes and their relatively large size, the traditional capillary sequencing-based diagnostic process represents an expensive and time-consuming solution. The emergence and spread of benchtop next-generation sequencing systems (NGS) offered the possibility to relocate the *BRCA1* and *BRCA2* mutation detection workflow onto these high-throughput platforms. This technology allows us to increase the throughput and detection sensitivity, enabling the identification of mutations from tumour samples even if they contain only trace amounts of tumour cells, which is a priority in understanding the process of tumour evolution and influencing its outcome. For this reason, I aimed at developing a comprehensive *BRCA* diagnostic method during my PhD work that is based on multiplex PCR amplification, next-generation sequencing, and computational variant identification, offering a reliable tool for the detection of both germline and sporadic *BRCA*-inactivating mutations.

During the development process, the coding exons of *BRCA1* and *BRCA2* were enriched from the genomic DNA by 80 PCR fragments, which were amplified in parallel in 9 multiplex reactions. The resulting products were digested by restriction enzymes, and NGS platform-specific adaptor sequences were ligated to the generated fragments. This resulted in a so-called fragment library, which, after size selection and quantification, was suitable for NGS on Illumina or Ion Torrent systems. Parallel to the

optimization of the wet-lab processes of sample preparation, I was also involved in the development of the software for NGS data analysis, NGSeXplorer. This software, in addition to the general modules of data analysis (de-multiplexing, mapping, variant calling), has some special algorithms that aim to reduce the high frequency of homopolymer sequencing errors specific to Ion Torrent PGM. The *BRCA* diagnostic process was developed using two different sample sets: a test sample set and a validation sample set. Both sample sets contained DNA samples with germline mutations in the *BRCA1* or *BRCA2* genes. The test sample set was used for the optimization of the fragment library preparation, sequencing, and data analysis with special attention to the algorithms for Ion Torrent sequencing error reduction. By the end of the extensive optimization process, we achieved proper coverage data for the entire target region of *BRCA1* and *BRCA2*, and variant detection successfully identified the germline mutations for each sample. After the initial optimization process, we blindly validated the diagnostic method on 20 samples each containing a unique pathogenic mutation. At the same time, we compared the mutation detection performance of the two most popular NGS platforms: Illumina MiSeq and Ion Torrent PGM. Illumina MiSeq correctly identified the known variants in all 20 retrospective samples with no false-positive or false-negative variant predictions. In the case of Ion Torrent PGM, the application of the variant filter set developed within the frame of NGSeXplorer led to a drastic reduction of false-positive results illustrated by the specificity of 97.3%. Though, in one of the 20 samples a true pathogenic mutation was also discarded by one of the above mentioned filters resulting in an experimental sensitivity of 95.0%.

A comprehensive diagnostic workflow for *BRCA1* and *BRCA2* must include the ability of specific and accurate detection of large genomic rearrangements in these

genes. For this reason, we tested the suitability of our diagnostic method for the detection of exon deletions and duplications. We had two test samples with known large rearrangements verified previously with MLPA analysis. The *BRCA* diagnostic method correctly identified these large deletions and duplications proving its suitability for the detection of large rearrangements.

In the past few years, the ability to detect *BRCA* mutations in tumour samples of ovarian cancer patients has become increasingly important. For this reason, we tested the performance of our method on DNA samples isolated from FFPE tissue blocks of ovarian cancer patients. From the first ten samples analysed, four harboured *BRCA1* mutations, three of them being germline and one somatic mutation. This latter was a novel *BRCA1* mutation (c.628C>T; p.Q210*) not reported previously in any database or reference. Finally, in this very same tumour sample we also managed to identify some steps of tumour evolution: one of the *BRCA1* alleles was inactivated by the stop-mutation mentioned above, while the remaining wild-type allele was lost during large genomic rearrangements (LOH: loss of heterozygosity). As a next step, we analysed the *BRCA* mutational status of 25 additional ovarian cancer samples. We identified pathogenic mutations in nearly half of the samples, and the majority affected the germline. Two of the 25 analysed mutations were considered somatic alterations present only in the tumour cells. The frequency of the mutant allele was shifted towards homozygous direction in most of the cases, indicating that the remaining wild-type *BRCA* allele was inactivated through LOH. These results draw the attention to how important it is in a comprehensive *BRCA* diagnostic process to analyse the mutational status of the tumour sample as well and that of the germline.

In summary, we developed a diagnostic method for the detection of *BRCA* mutations. The method was successfully tested on both germline and FFPE samples,

and it was validated on a wide spectrum of pathogenic mutations using Illumina and Ion Torrent sequencers as well. The method is suitable for the detection of certain steps of *BRCA* tumour evolution using FFPE tumour samples, and, in combination with Illumina MiSeq sequencing, meets the sensitivity and specificity requirements for clinical diagnostics.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Haracska Lajosnak, hogy lehetővé tette csoportjában a PhD munkám végzését. Köszönöm állandó támogatását és a munkám végzéséhez nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönöm az SZTE ÁOK Pathológiai Intézet munkatársainak, Dr. Sükösd Farkasnak, Hajdu Adriennek és Dr. Pankotai-Bodó Gabriellának a munkámhoz elengedhetetlen betegminták biztosítását.

Köszönöm Prof. Dr. Boros Imrének és Dr. Bodai Lászlónak, a SZTE Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék munkatársainak, hogy vizsgálataimhoz használhattam Illumina MiSeq szekvenáló berendezésüket.

Köszönöm Jaksa Gábornak és Pintér Lajosnak, az NGSeXplorer fejlesztőinek, hogy a szoftvert rendelkezésemre bocsájtották.

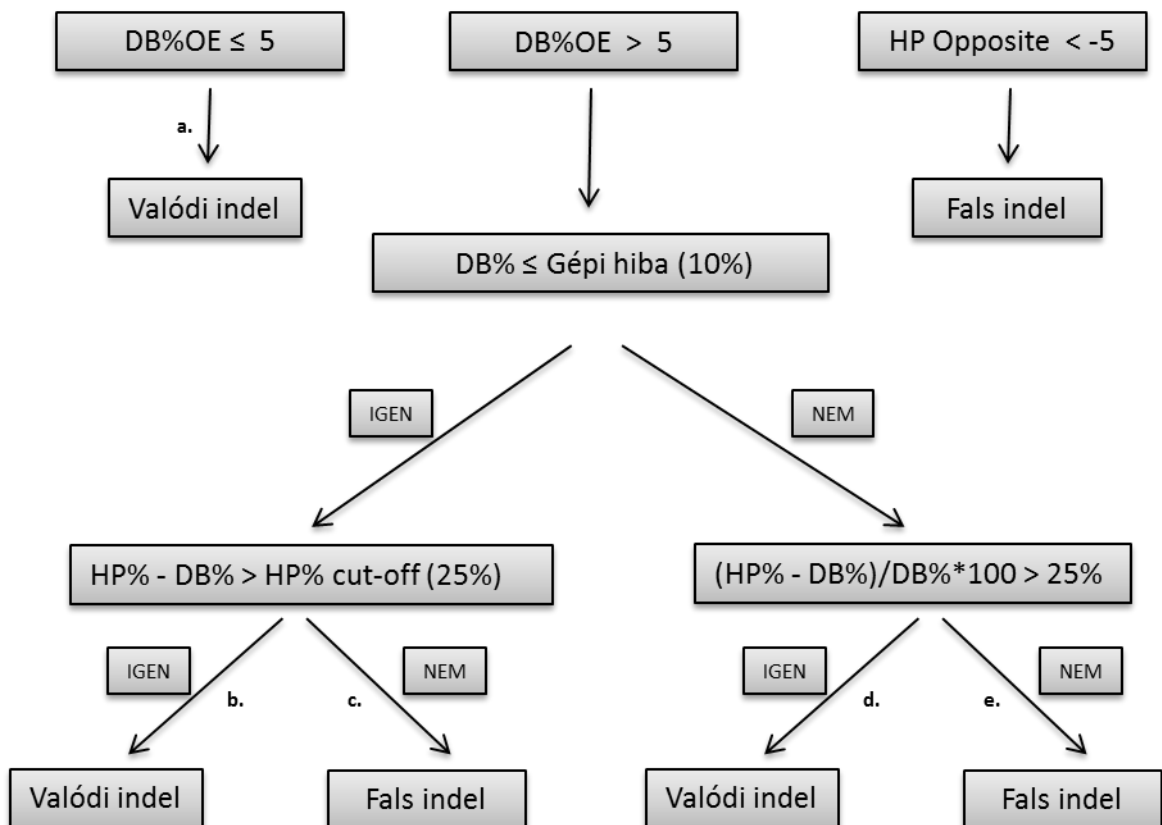
Köszönöm az SZBK Genetikai Intézetnek, hogy lehetőséget biztosított a PhD munkám végzéséhez. A Mutagenézis és karcinogenezis kutatócsoport és a DeltaBio2000 Kft minden tagjának köszönöm a munkámban nyújtott segítségét, hasznos tanácsait és ötleteit. Köszönettel tartozom Kovács Katalinnak, Nótári Péternének és Németh Anitának a szakasszisztenciáért.

Köszönöm szüleimnek a támogatást és biztatást.

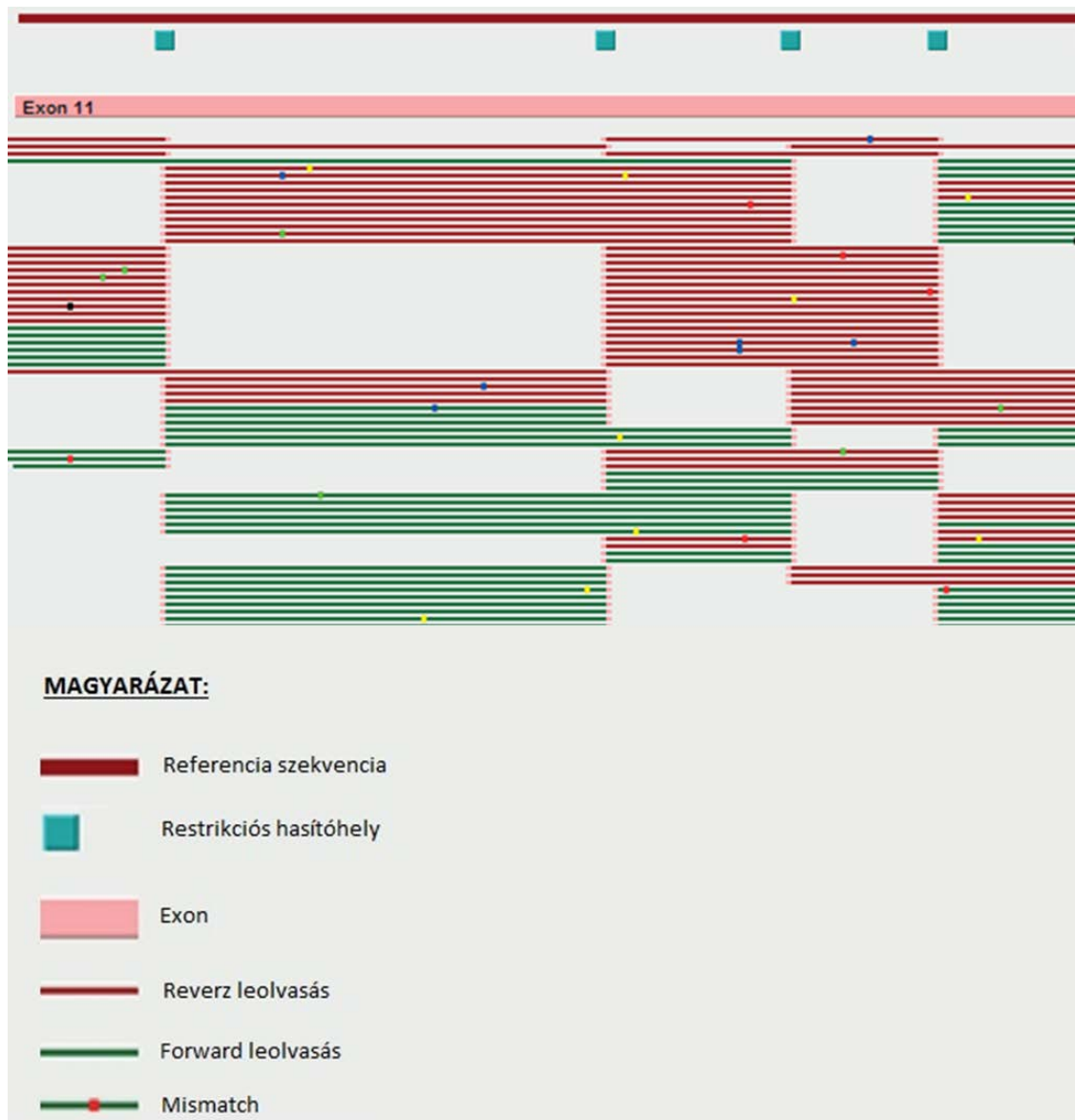
A munkámhoz szükséges anyagi támogatást a GINOP-2.3.2-15-2016-00020 és a GINOP-2.3.2-15-2016-00001 pályázatok biztosították.

12. FÜGGELÉK

F1. Ábra. A HP% variáns-szűrő algoritmus működése. Rövidítések: DB% – az Indel frekvenciája az adatbázisban, OE – Indellel ellentétes esemény, DP%OE – az Indellel ellentétes esemény frekvenciája az adatbázisban, S% – az Indel frekvenciája a mintában, S%OE – az Indellel ellentétes esemény frekvenciája a mintában. HP Opposite=DB%OE-S%OE; HP%=S%+HP Opposite. Az *a,b,c,d,e* esetek az F1. Táblázatban vannak bemutatva.



F2. Ábra. A restrikciós enzimekkel emésztett fragmentek leolvasásainak grafikus megjelenítése az NGSeXplorer segítségével.



F1. Táblázat. Eset-példák a HP% variáns-szűrő algoritmus működésére. +1 jelenti az egy nukleotidos inszerciót, 0 a vad típust (WT), míg -1 az egy nukleotidos deléciót a szekvencia adott pontján. A variáns-szűrő ezekben a példákban a bekeretezett eseményekkel szemben volt tesztelve. További rövidítések magyarázata az F1 ábránál.

Eset	Variáns	Minta	Adatbázis	DB%OE	DB%	HP Opposite (DB%OE-S%OE)	HP% (S%+HP Opposite)	HP% - DB%	(HP% - DB%) /DB%*100	Eredmény
a.	1	28%	10%							Valódi Indel
	0	73%	85%	3%<5%						
	-1	2%	3%							
b.	1	35%	9%							Valódi Indel
	0	65%	85%	8%>5	9%<10	3%	38%	29%>25%		
	-1	5%	8%							
c.	1	30%	9%							Fals Indel
	0	65%	85%	8%>5	9%<10	-4%	26%	17%<25%		
	-1	12%	8%							
d.	1	25%	20%							Valódi Indel
	0	73%	85%	10%>5	20%<10	3%	28%	40%<25%		
	-1	7%	10%							
e.	1	18%	20%							Fals Indel
	0	73%	85%	10%>5	20%<10	13%	21%	5%<25%		
	-1	7%	10%							

F2. Táblázat. Az ováriumtumor-mintákban és azok normál párjában azonosított *BRCA1-2* variánsok táblázata. A kóroki mutációk és mutáns minták pirossal kiemelve.

Gén	Variáns			NT-1		NT-2		NT-3		NT-4		NT-5		NT-6		NT-7		NT-8		NT-9		NT-10		
	HGVS cDNA	HGVS Protein	dbSNP	P.vér	Tumor	Normál	Tumor	P.vér	Tumor	P.vér	Tumor	Normál	Tumor	P.vér	Tumor	P.vér	Tumor	Normál	Tumor	P.vér	Tumor	P.vér	Tumor	
BRCA1	c.-19-115T>C	p. IVS1-115 T>C	rs3765640			41%	23%									55%	66%	65%	91%	53%	61%			
BRCA1	c.441+63_441+74delCTTTTTTTTT	p. IVS7+36 delCTTTTCTTTTTTT	rs373413425			45%	26%	46%	53%							38%	61%	59%	87%	36%	49%			
BRCA1	c.442-34C>T	p. IVS7-34 C>T	rs799923	42%	16%					47%	38%													
BRCA1	c.547+146A>T	p. IVS8+146 A>T	rs8176140			45%	36%	50%	68%							56%	72%							
BRCA1	c.548-68_548-68delT	p. IVS8-58 delT	rs273902772			13%	38%									62%	73%			50%	66%			
BRCA1	c.628C>T	p. Q210*	-															0%	87%					
BRCA1	c.2077G>A	p. D693N	rs4986850					23%	57%															
BRCA1	c.2082C>T	p. S694	rs1799949			47%	13%	36%	57%							46%	16%	51%	93%	49%	57%			
BRCA1	c.2311T>C	p. L771	rs16940			54%	12%	52%	61%							51%	30%	56%	92%	46%	60%			
BRCA1	c.2591C>T	p. S864L	rs80357003						17%									45%	91%					
BRCA1	c.2612C>T	p. P871L	rs7999117			48%	30%	48%	66%							49%	75%			43%	58%			
BRCA1	c.2635G>A	p. E879K	rs80357251													0%	70%							
BRCA1	c.3113A>G	p. E1038G	rs16941			54%	25%	53%	31%							49%	29%	46%	89%	49%	58%			
BRCA1	c.3548A>G	p. K1183R	rs16942			51%	35%	49%	56%							49%	26%	49%	89%	50%	60%			
BRCA1	c.4097-141A>C	p. IVS11-141 A>C	rs7999116			51%	13%	47%	34%							47%	24%	43%	94%	50%	58%			
BRCA1	c.4308T>C	p. S1436	rs1060915			50%	25%	53%	60%							45%	90%	52%	92%	36%	49%			
BRCA1	c.4357+117G>A	p. IVS13+117 G>A	rs3737559															49%	91%					
BRCA1	c.4837A>G	p. S1613G	rs1799966			50%	24%	54%	60%							45%	75%	48%	92%	47%	58%			
BRCA1	c.4986+222A>G	p. IVS16+222 A>G	rs3092987			56%	48%									64%	53%	74%	92%	41%	68%			
BRCA1	c.5152+66G>A	p. IVS18+66 G>A	rs3092994			47%	24%									37%	70%	47%	90%	46%	58%			
BRCA1	c.5251C>T	p. R1751*	rs80357123																			44%	92%	
BRCA1	c.5263_5264insC	p.Ser1755fs	rs80357906			50%	70%					49%	63%											
BRCA2	c.-26G>A	-	rs1799943			49%	48%	87%	99%															
BRCA2	c.68-7T>A	p. IVS2-7 T>A	rs81002830			60%	37%																	
BRCA2	c.425+67A>C	p. IVS4+67 A>C	rs11571610																		67%	66%		
BRCA2	c.426-89T>C	p. IVS4-89 T>C	rs3783265																		48%	48%		
BRCA2	c.865A>C	p. N289H	rs766173																		40%	41%		
BRCA2	c.1114C>A	H372N	rs144848							47%	73%			46%	83%	53%	77%							
BRCA2	c.1365A>G	p. S455	rs1801439																		35%	40%		
BRCA2	c.1910-74T>C	p. IVS10-74 T>C	rs2320236			60%	100%																	
BRCA2	c.1910-51G>T	p. IVS10-51 G>T	rs11571651																		54%	40%		
BRCA2	c.2229T>C	p. H743	rs1801499																		50%	42%		
BRCA2	c.2971A>G	p. N991D	rs1799944																		43%	43%		
BRCA2	c.3396A>G	p. K1132	rs1801406			14%	65%	96%	100%															
BRCA2	c.3807T>C	p. V1269	rs543304	94%	100%					47%	37%					47%	14%	53%	52%			99%	99%	
BRCA2	c.7806-14T>C	p. IVS16-14 T>C	rs9534262			51%	45%					48%	53%	56%	87%			33%	39%	96%	98%			
BRCA2	c.9257-16T>C	p. IVS24-16 T>C	rs11571818									51%	50%											