Spectrum of Variants Detected in Cancer Susceptibility Genes Analyzed in Turkish Pancreatic Cancer Patients

Türk Pankreas Kanseri Hastalarında Kanser Yatkınlık Genlerinde Tespit Edilen Varyantların Spektrumu

Taha BAHSİ[1], Hanife SAAT[2]

[1]SBÜ Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik, Ankara
[2]SBÜ Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazit Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik, Ankara

Dergiye Ulaşma Tarihi: 27.03.2020 Dergiye Kabul Tarihi: 31.03.2020 Doi: 10.5505/aot.2020.82574

ÖZET

GİRİŞ ve AMAÇ: Pankreas kanseri, tüm diğer kanser türleri arasında en yüksek mortalite oranına sahip olan türdür. Pankreas kanserinin 2030 yılına kadar akciğer kanserinden sonra en sık ölüme sebebiyet veren kanser türü olacağı ön görülmektedir. BRCA1, BRCA2, CDKN2A, ATM, PALB2 ve Lynch sendromu genleri pankreas kanserine yatkınlık oluşturmaktadır. Bu genlerde ki patojenik veya şüpheli varyantların bilinmesi önemlidir. Bizde çalışmamızda ailesel yatkınlık olduğu düşünülen Türk pankreas kanseri hastalarında ki varyantları araştırmayı hedefledik.

YÖNTEM ve GEREÇLER: Pankreas kanseri nedeni ile başvuran ve soygeçmişinde çok sayıda kanser öyküsü bulunan 16 hastanın sonuçları retrospektif olarak incelendi. Hastalara ait DNA örnekleri yeni nesil DNA dizi analizi yöntemi ile dizilendi.

BULGULAR: Çalışma sonucunda 7 hastada hastalık sebebi olduğunu düşündüren herhangi bir değişim saptanmadı. Beş hastada klinik önemi bilinmeyen (VUS) değişim, 3 hastada patojenik ve bir hastada ise muhtemel patojenik değişim tespit edildi.

TARTIŞMA ve SONUÇ: Çalışma sonrasında daha önce pankreas kanseri ile ilişkili olduğu bilinen genlerde patojenik değişimler saptadık. Özellikle BRCA2, ATM ve MEN1 geninde bulunan değişimlerin hastalıkla güçlü bir ilişkisi olduğunu düşünmekteyiz. Türk pankreas kanseri hastalarında daha önce böyle bir çalışma yapılmamış olmasının yanında yeni tespit ettiğimiz varyantların literatüre katkısı olacağını düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Pankreas Kanseri, Herediter Kanser Paneli, Yeni Nesil DNA Dizi Analizi

ABSTRACT

INTRODUCTION: Pancreatic cancer has the highest mortality among the all cancers. It is predicted that pancreatic cancer will be the most common cancer that causes death after lung cancer until 2030. BRCA1, BRCA2, CDKN2A, ATM, PALB2 and Lynch syndrome genes predispose to pancreatic cancer. It is important to know the pathogenic or VUS variants in these genes. In our study, we aimed to investigate variants in Turkish pancreatic cancer patients who are thought to have familial predisposition.

METHODS: The results of 16 patients who referred to for pancreatic cancer and had a family history of cancer history were analyzed retrospectively. DNA samples of the patients were sequenced by the next generation DNA sequence analysis method.

RESULTS: As a result of the study, no change was detected in 7 patients suggesting the cause of the disease. Five patients had unknown clinical significance (VUS) variant, three patients had pathogenic variant and one patient had likely pathogenic variant.

DISCUSSION AND CONCLUSION: In this study, we detected pathogenic variants in genes previously known to be associated with pancreatic cancer. We think that especially the variants in BRCA2, ATM and MEN1 gene have a strong relation with the pancreatic cancer. We think that in Turkish pancreatic cancer patients, such a study has not been done before and the new variants we have identified will contribute to the literature.

Keywords: Pancreatic cancer, Hereditary cancer panel, Next Generation DNA Sequencing

Adress for correspondence:Ankara Onkoloji Hastanesi Ankara/Türkiye
e-mail: tahabahsi@yahoo.com
Available at www.actaoncologicaturcica.com
Copyright ©Ankara Onkoloji Hastanesi

GİRİŞ

Pankreas kanseri, tüm diğer kanser türleri arasında en yüksek mortalite oranına sahip olan türdür. 2019 yılında ABD'de 56.700 yeni vaka ve pankreas kanseri kaynaklı 45,750 ölüm bildirilmiştir (1). Son üç yılda dahi yeni vaka ve mortalite oranlarının yaklaşık %8 civarında arttığı da göz önüne alındığında, pankreas kanserinin 2030 yılına kadar akciğer kanserinden sonra en sık ölüme sebebiyet veren kanser türü olacağı ön görülmektedir (2, 3). Pankreatik neoplazilerin tamamına yakınını oluşturan duktal adenokarsinom, aynı zamanda tedaviye de en dirençli türdür. Hastalığın hızlı bir şekilde mortaliteye ilerlemesi, hastalık üzerine yapılan araştırmaları da kısıtlamaktadır.

BRCA1, BRCA2, CDKN2A, Lynch sendromu ile ilişkili yanlış-eşleşme tamir genleri ve herediter pankreas kanseri ilişkili genlerin (PRSS1 ve SPINK2), pankreas kanserlerinde risk artışına sebep olduğu kanıtlanmıştır. PALB2 ve ATM genlerinin germinal hücrelerdeki patojenik ve olası patojenik varyasyonları da pankreas kanserine yatkınlık oluşturmaktadır. Bu durum, özellikle soy geçmişinde öykü olmayan de novo/sporadik vakalarda şüphenin PALB2 ve ATM genlerine yönelmesine sebep olmaktadır. Yakın dönemde literatüre kazandırılma ihtimali olan, kanser ailelerine yapılan geniş tabanlı genomik analizlerle tespit edilmiş ve fonksiyonel analizleri devam eden aday genler olmasına rağmen, mevcut durumda pankreas kanseri açısından en yüksek risk BRCA2 ve CDKN2A genlerinin patojenik varyantları ile oluşmaktadır. Yatkınlık genlerinin kalıtım paternleri otozomal resesif ve otozomal dominant olarak değişmekle birlikte, kliniğe etkileri tek gen hastalıklarında görülen patojenik varyantların aksine, çevresel etkenler ve diğer birçok faktörlerle birlikte değişkenlik göstermektedir (4).

Yeni nesil dizileme teknolojilerinden önce ailesel pankreas kanserlerinin tanısının rutin tanı hizmetleri vasıtasıyla konmasının, birçok açıdan limitasyonlar içerdiği bilinmektedir. Kanser yatkınlık genlerinden oluşan genetik tanı panelleri ile birlikte bu limitasyonlar kalkmış, yüksek çıktılı dizileme platformları rutin tanı hizmetleri kapsamında bu testlerin uygulanabilirliğine katkıda bulunmuştur. Sağlıklı ve hasta bireylere ait veritabanları bu dönemde geliştirilmiş ve özellikle hastalık veritabanları gönüllü kullanıcıların veri paylaşımı ile gün geçtikçe daha da genişlemektedir (5, 6). Dizileme sonucunda elde edilen genomik varyantların yorumlanmasında özellikle sağlıklı birey verileri, önemi belirsiz değişiklikler hakkında yapılan değerlendirmeler açısından önem taşımaktadır. Bu kapsamda ülkemizde hala yapılanma aşamasında olan Türk Genom Projesi'nin ciddi bir ihtiyaca cevap vereceği düşünülmektedir.

Kanser yatkınlıklarının spektrumu farklı milliyetler ve farklı coğrafyalar arasında çeşitlilik göstermektedir (7). Pankreas kanserinin aileselliği ile ilgili dünyada yapılmış birçok çalışma olmakla birlikte, ülkemizde özellikle yeni nesil dizileme tabanlı çalışmalar açısından yeterli veri bulunmamaktadır (8, 9). Genetik testlerin uygulanması hususunda ulusal bir sağlık politikasının geliştirilebilmesi için yatkınlık genlerindeki varyasyonların dağılımının belirlenmesi ve kurucu mutasyonların tanımlanması gerekmektedir. Bu kapsamda, çalışmamız bu sürece katkı sağlamak amacıyla planlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Hasta ve Örnek Seçimi

2018-2019 yılları arasında Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazit Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Genetik Kliniklerine pankreas kanseri nedeniyle başvurmuş olan 16 hastaya ait genetik test sonuçları retrospektif olarak incelendi. Hastalar seçilirken özgeçmiş ve soygeçmişinde ailesel kanserlere yatkınlık şüphesi dikkate alındı. Hastaların tamamının soygeçmişinde (birinci ve ikinci derece yakınlarında) en az dört kanser hastası vardı. Hastalardan test öncesi bilgilendirilmiş DNA onam formu alınmıştır.

DNA Eldesi ve Genetik Test

Hastalara ait periferik kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındıktan sonra QIAcube® otomatik DNA izolasyon sistemi (Qiagen Inc. Mississauga, ON, Kanada) ile DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen DNA örnekleri QIAGEN Geniş Herediter Kanser Paneli (Qiagen, Hilden, Germany) ve Herediter Kanser Solüsyon v1.1 Paneli kullanılarak Illumina Miseq llumina Inc., San Diego, CA, USA) yeni nesil DNA dizi analiz sistemi ile

Adress for correspondence:Ankara Onkoloji Hastanesi Ankara/Türkiye
e-mail: tahabahsi@yahoo.com
Available at www.actaoncologicaturcica.com
Copyright ©Ankara Onkoloji Hastanesi

dizilendi. Bu panellere ait gen içerikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Dizileme işlemi sonucu elde edilen veriler QIAGEN Clinical Insight (QCI™) ve Sophia DDM software (Sophia Genetics, Saint-Sulp) varyant analiz programları ile analiz edildi. Analiz için ayrıca in-silico veritabanları ve literatür verileri de kullanıldı. Homopolimer bölge, insersiyon ve delesyon değişimleri ve splice bölge mutasyonları sanger yöntemi ile doğrulandı.

Tablo 1. Panellerin gen içerikleri

QIAGEN QIASEQ HEREDITARY CUSTOM CANCER PANEL	SOPHIA HEREDITARY CANCER SOLUTION PANEL
AIP, APC, ATM, ATR, AXIN2, BAP1, BARD1, BLM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BUB1B, CDH1, CDK4, CDKN2A, CHEK2, CTNNA1, EPCAM, FAM175A, FANCC, FLCN GALNT12,GEN1,GPC3,GREM1, HOXB13, MET, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NTHL1, PALB2, PALLD, PIK3CA, PMS1, PMS2, POLD1, PRSS1, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RET, RINT1, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, SMARCA4, STK11, TP53, VHL, XRCC2	*ATM, APC, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, FAM175A, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PIK3CA, PMS2, PMS2CL, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53, XRCC2*

Varyant Analizi

Varyant analizleri ACMG/AMP standartlarına göre varyant analiz programları yardımı ile veritabanları ve literatüre göre yorumlanmıştır. Patojenik varyant sınıflandırmaları; klinik bulgular ve aile öyküsü, bağımsız destekleyici gözlemler ile fonksiyon çalışmalarına göre kılavuzlar tarafından belirlenmiştir. Muhtemel patojenik varyantların protein fonksiyonu üzerinde potansiyel zararlı olduğu tahmin edilerek hastalığın muhtemel sebebi kabul edilmektedir (>%90 hasatlık sebebi). Klinik önemi bilinmeyen (VUS) varyantlar ise protein üzerinde etkisi bilinmeyen veya şüpheli olan varyantlardır.

BULGULAR

Pankreas kanseri nedeni ile kliniğimize başvuran 16 hastaya herediter kanserlere yatkınlık oluşturduğu bilinen genleri kapsayan genetik panellerin sonuçları analiz edilerek değerlendirildi. Onaltı hastanın yedisinde hastalığa sebep olabileceği düşünülen herhangi bir değişiklik saptanmadı. Beş hastada klinik önemi bilinmeyen (VUS) değişiklik saptandı. Üç hastada patojenik ve bir hastada ise muhtemel patojenik mutasyon belirlendi. *MSH6* ve *VHL* geninde aynı hastada VUS değişimi bulunurken diğer VUS değişimleri *MSH2, ATM, NTHL1* ve *BRCA2* geninde saptandı. Patojenik mutasyonlar ise *MEN1, BRCA2, ATM ve MUTYH* genlerinde belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Patojenik ve VUS varyantlar

n	Gen	Transkript ID	Lokasyon	cDNA Değişikliği	Mutasyon Tipi	Varyant Tipi
1	*ATM*	NM_000051	Ekzon 13	c.1952T>C	Missense	VUS[1]
1	*ATM*	NM_000051	İntron 43	c.6199-1G>T	Splicing	Patojenik
1	*BRCA2*	NM_000059.3	Ekzon 10	c.1773_1776delTTAT	Frameshift	Patojenik
1	*BRCA2*	NM_000059.3	Ekzon 11	c.5092T>C	Missense	VUS[1]
1	*BRCA2*	NM_000059.3	Ekzon 11	c.4599A>C	Missense	VUS[1]
1	*MEN1*	NM_000244.3	Ekzon 08	c.1199delAinsCTT	Frameshift	Patojenik
1	*MSH6*	NM_000179.2	Ekzon 05	c.3359A>G	Missense	VUS[1]
1	*MUTYH*	NM_001128425.1	Ekzon 09	c.734G>A	Missense	M. Patojenik[2]
1	*NTHL1*	NM_002528.7	Ekzon 02	c.298C>T	Missense	VUS[1]

[1]VUS: variant of uncetain significnce - önemi belirsiz değişiklik, [2]M. Patojenik: muhtemel patojenik

TARTIŞMA

Pankreas kanseri tanılı hastaların %25'inde patojenik/olası patojenik varyant tespit edilmesi, pankreas kanseri tanısı alan her hastanın herediter kanser paneli uygulaması için tıbbi genetik polikliniğine konsülte edilmesi

Adress for correspondence:Ankara Onkoloji Hastanesi Ankara/Türkiye
e-mail: tahabahsi@yahoo.com
Available at www.actaoncologicaturcica.com
Copyright ©Ankara Onkoloji Hastanesi

gerektiğini göstermektedir. *BRCA2* c.1773_1776delT (NM_000059.3) ve *ATM* c.6199-1G>T (NM_000051) patojenik varyasyonları, yazıda da belirtilen ve hasar verici mutasyonları pankreas kanserine neden olan genlerde meydana gelmişlerdir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin genin anlamlı bir kısmını etkileyen fonksiyon kaybettirici varyasyonları hem hastalık veritabanlarında hem de in siliko tahmin algoritmalarında patojenik olarak belirtilmektedir. *ATM* geninin splice bölgesindeki değişiklikler ise ClinVar veritabanında, hastadaki varyasyon da bu gruba dahil olmak üzere, patojenik olarak bildirilmiştir.

MUTYH geninin homozigot değişiklikleri kolorektal kanserlerle ilişkilendirilmiş olmakla birlikte, homozigot bireyler kadar risk taşımamakla birlikte heterozigot bireylerde de yatkınlık tespit edilmiştir (10, 11). Hastada tespit edilen heterozigot varyantla birleşik heterozigosite üzerinden klinik oluşturabilecek başka bir şüpheli varyant tespit edilmemiştir. Ayrıca tek gen hastalıkları, büyük ölçüde dizi analizi yöntemi ile tanı alabilse de hastalığa sebep olan moleküler değişikliklerin az bir kısmı dizi teknolojilerinin tespit edemediği kopya sayısı değişiklikleri kapsamında oluşmaktadır (12). Her ne kadar kullanılan analiz programları aynı kontrol örneklerine ait genomik datanın okuma derinliklerinin karşılaştırılması üzerinden kopya sayısı değişikliklerini düşük hassasiyette analiz etmeye olanak sağlasa da, elde edilen sonuçlar mikrodizin veya MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) yöntemi ile doğrulanmak zorundadır (13). Bu minvalde *MUTYH* genine ait veride birleşik heterozigosite oluşturacak kopya sayısı değişikliği de tespit edilmemiştir.

MEN1 geninin mutasyonlarında genellikle pankreatik nöroendokrin tümörler görülmekle birlikte pankreatik duktal adenokarsinomlarda da bildirilmiştir (14-16). Tarafımıza danışılan *MEN1* c.1199delAinsCTT (NM_000244.3) patojenik varyasyonu tespit edilen hasta duktal adenokarsinom tanısı almış olup, henüz *MEN*1 ile ilişkili neoplaziler açısından tanı almamıştır. Söz konusu genomik değişikliğin tanıya etkisi fonksiyon çalışmalarından elde edilen verilerle anlaşılabilecektir. *MEN1* genindeki patojenik veya olası patojenik varyantların pankreatik duktal adenokarsinoma katkısı hakkındaki veriler henüz yeterli seviyede değildir. Bu sebeple bu türden vakaların *MEN1*'in pankreatik duktal adenokarsinom gelişimine katkısına ışık tutacaktır.

Analizler sırasında elde edilen kimi varyantlar bazen çelişkili sonuçlar bazen de kanıt yetersizliği sebebiyle önemi belirsiz değişiklik (VUS) olarak sınıflanmaktadır. Bu türden değişikliklerin rapor edildiği durumlarda, varyantların belirli aralıklarla yeniden sınıflama kriterlerine tabi tutulması gerektiği bildirilmektedir (17).

Tüm bu veriler ışığında, genetik tanı olanaklarının yaygınlaşması ile pankreatik kanserlerin moleküler mekanizmalarının anlaşılması sonucunda genetik danışmanlığın koruyucu ve önleyici fonksiyonunun daha ileri düzeye taşınacağı; kanser tanısı almış bireylerde ise kişiye özel tedavi ile daha efektif tedavi olanaklarının gelişeceği düşünülmektedir.

REFERANSLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA: a cancer journal for clinicians. 2019;69(1):7-34.
2. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. Cancer research. 2014;74(11):2913-21.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA: a cancer journal for clinicians. 2016;66(1):7-30.
4. Roberts NJ, Norris AL, Petersen GM, Bondy ML, Brand R, Gallinger S, et al. Whole genome sequencing defines the genetic heterogeneity of familial pancreatic cancer. Cancer discovery. 2016;6(2):166-75.
5. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. Nucleic acids research. 2016;44(D1):D862-D8.
6. Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, Solomonson M, Ruderfer DM, Kavanagh D, et al. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. Nucleic acids research. 2017;45(D1):D840-D5.
7. John EM, Miron A, Gong G, Phipps AI, Felberg A, Li FP, et al. Prevalence of pathogenic BRCA1 mutation carriers in 5 US racial/ethnic groups. Jama. 2007;298(24):2869-76.
8. Bahsi T, Erdem HB. Spectrum of BRCA1/BRCA2 variants in 1419 Turkish breast and ovarian cancer patients: a single center study. Turkish Journal of Biochemistry.
9. Erdem HB, Bahsi T. Multigene panel testing for hereditary breast cancer: An analysis of 70

Adress for correspondence:Ankara Onkoloji Hastanesi Ankara/Türkiye
e-mail: tahabahsi@yahoo.com
Available at www.actaoncologicaturcica.com
Copyright ©Ankara Onkoloji Hastanesi

BRCA-negative Turkish patients. Cumhuriyet Tıp Dergisi. 2019;41(3):569-75.

10. Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, Wiltshire A, Prendergast J, Porteous M, et al. Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. The American Journal of Human Genetics. 2005;77(1):112-9.

11. Jones Sn, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, et al. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G: C→ T: A mutations. Human Molecular Genetics. 2002;11(23):2961-7.

12. Torrezan GT, da Silva FC, Krepischi AC, Santos ÉM, de O Ferreira F, Rossi BM, et al. Breakpoint characterization of a novel large intragenic deletion of MUTYH detected in a MAP patient: Case report. BMC medical genetics. 2011;12(1):128.

13. Slater H, Bruno D, Ren H, Pertile M, Schouten J, Choo K. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). Journal of medical genetics. 2003;40(12):907-12.

14. Lopez CL, Waldmann J, Fendrich V, Langer P, Kann PH, Bartsch DK. Long-term results of surgery for pancreatic neuroendocrine neoplasms in patients with MEN1. Langenbeck's archives of surgery. 2011;396(8):1187.

15. Karges W, Maier S, Schmidt F, Gress TM, Boehm BO. Role of the MEN1 tumour suppressor gene in human ductal pancreatic cancer. Cancer letters. 2000;157(1):51-5.

16. Karpathakis A, Pericleous M, Luong TV, Khoo B, Thirlwell C, Toumpanakis C, et al. Pancreatic adenocarcinoma in a patient with multiple endocrine neoplasia 1 syndrome. Pancreas. 2013;42(4):725.

17. Murray ML, Cerrato F, Bennett RL, Jarvik GP. Follow-up of carriers of BRCA1 and BRCA2 variants of unknown significance: variant reclassification and surgical decisions. Genetics in Medicine. 2011;13(12):998-1005.

Adress for correspondence:Ankara Onkoloji Hastanesi Ankara/Türkiye
e-mail: tahabahsi@yahoo.com
Available at www.actaoncologicaturcica.com
Copyright ©Ankara Onkoloji Hastanesi