

medgen 2015 · 27:211–216
DOI 10.1007/s11825-015-0049-z
Online publiziert: 6. August 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015



Jan Hauke^{1,2,3} · Christoph Engel⁴ · Barbara Wappenschmidt^{1,2,3} · Clemens R. Müller⁵ · Eric Hahnen^{1,2,3}

¹ Zentrum Familiärer Brust- und Eierstockkrebs, Universitätsklinikum Köln, Köln, Deutschland

² Centrum für Integrierte Onkologie (CIO) Köln, Köln, Deutschland

³ Centrum für Integrierte Onkologie (CIO) Bonn, Bonn, Deutschland

⁴ Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE), Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland

⁵ Biozentrum, Institut für Humangenetik, Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland

Klassifizierung von „variants of unknown significance“ (VUS) beim familiären Brust- und Eierstockkrebs

Hintergrund

Eine zentrale Aufgabe gendiagnostischer Labore ist die Klassifizierung und Bewertung von identifizierten Sequenzvarianten. In einigen Fällen ist die funktionelle Konsequenz der Sequenzvarianten unklar (variant of unknown significance, VUS), sodass die molekulargenetische Diagnostik nicht zu einer eindeutigen Aussage kommen kann. Während dies bei alleiniger Testung der Risikogene *BRCA1* und *BRCA2* heute weniger als 6 % aller Ratsuchenden betrifft, wird der Anteil der VUS im Rahmen der umfassenden Analyse zusätzlicher Risikogene (Paneldiagnostik) zunächst deutlich ansteigen. Die Klassifizierung der VUS in non-*BRCA1/2*-Genen (z. B. *ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *TP53*) ist daher für die diagnostischen Labore ebenso wie für die Ratsuchenden von erheblicher Bedeutung. In diesem Übersichtsartikel werden die etablierten Strategien des Deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs (GC-HBOC) zur VUS-Klassifizierung aufgezeigt und aktuelle Erfahrungen im Rahmen der Paneldiagnostik bei einem Verdacht auf eine erbliche Disposition für Brust- bzw. Eierstockkrebs dargestellt.

Neue Herausforderungen durch die Analyse von gene panels

Durch die Etablierung kosteneffizienter Next Generation Sequencing (NGS)-Technologien wird sich die Gendiagnostik bei erblichen Tumorprädispositionserkrankungen von der stufenweisen Analyse einzelner Gene zu einer umfassenden, parallelen Untersuchung vieler tumorprädisponierender Gene weiterentwickeln (Paneldiagnostik). Für den erblichen Brust- und Eierstockkrebs (BC/OC) verzeichnen wir hierdurch zunächst einen sprunghaften Anstieg der VUS-Quote, bedingt durch die zusätzliche Analyse von Risikogenen, die bislang deutlich weniger gut charakterisiert sind als *BRCA1* und *BRCA2*. Neben seltenen Missense-Mutationen in non-*BRCA1/2*-Genen, die häufig aufgrund der noch schwachen Datenlage zunächst als VUS eingeordnet werden müssen, stellen auch weitere Mutationstypen in diesen Genen vielfach eine Herausforderung dar. In einer aktuellen Publikation von Romero et al. konnte z. B. gezeigt werden, dass das *BRCA1*-Spleißmuster im Blut dem in Brustgewebe entspricht [1]. Ob dies auch für die Gruppe der non-*BRCA1/2*-Gene zutrifft, ist noch unklar und sollte bei der Klassifizierung potenzieller Spleißmutationen in diesen Genen bedacht werden. In *BRCA1* und *BRCA2* wurden carboxyterminale, proteintrunkierende Mutationen beschrieben, die ba-

sierend auf epidemiologischen Daten als nicht pathogen eingestuft werden konnten. Die Klassifizierung carboxyterminaler proteintrunkierender Mutationen, die potenzielle Pathogenität synonyme Varianten durch differenzielles „codon usage“ [2] oder auch regulatorischer Mutationen wird aufgrund der aktuell schlechten Datenlage für non-*BRCA1/2*-Gene zunächst schwierig sein und daher zu einer Erhöhung der VUS-Rate führen. Die Herausforderung der VUS-Klassifizierung insbesondere in non-*BRCA1/2*-Genen wird daher in den nächsten Jahren einen hohen Stellenwert in der Forschung einnehmen. Sie kann jedoch insbesondere durch internationale wissenschaftliche Kooperationen bewältigt werden.

Die Einteilung von Sequenzvarianten in 5 Klassen

Das vom GC-HBOC verwendete „5-tier“-System zur Einteilung von Sequenzveränderungen basiert auf dem international etablierten Klassifizierungssystem, welches erstmals 2008 von Sharon Plon und Kollegen im Namen der Internationalen Agentur für Krebsforschung (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) vorgeschlagen wurde [3]. Dabei werden die zu bewertenden Varianten entsprechend der Wahrscheinlichkeit ihrer Pathogenität in eine von 5 Klassen eingeteilt (1 = neutral, 2 = wahrscheinlich

Tab. 1 Klassifizierung von *BRCA1/2*-Varianten und die daraus resultierenden klinischen Konsequenzen sowie Empfehlungen für die Testung gesunder Angehöriger im GC-HBOC (modifiziert nach Plon et al. [3], Tab. 2 und 3)

Klasse	Beschreibung	Wahrscheinlichkeit für Pathogenität	Klinische Konsequenz bei Vorliegen einer pathogenen Variante beim Indexpatienten	Empfehlung für weitere Testung
5	Eindeutig pathogen	> 0,99	Früherkennung und ggf. prophylaktische Operationen ^a	Prädiktive Testung gesunder Angehöriger
4	Wahrscheinlich pathogen	0,95–0,99	Früherkennung und ggf. prophylaktische Operationen ^a	Prädiktive Testung gesunder Angehöriger bzw. Testung im Rahmen der Forschung zur weiteren Klassifizierung der Variante
3	Unklare Signifikanz	0,05–0,949	Keine prophylaktischen Operationen; Verbleib in der Früherkennung abhängig von der Risikoberechnung ^a	Keine prädiktive Testung. Ggf. Segregationsanalyse im Rahmen der Forschung zur Klassifizierung der Variante
2	Wahrscheinlich neutral oder ohne klinische Signifikanz	0,001–0,049	„Entlastung“. Keine Früherkennung und keine prophylaktischen Operationen	Keine prädiktive Testung. Ggf. Segregationsanalyse im Rahmen der Forschung zur weiteren Klassifizierung der Variante
1	Neutral oder ohne klinische Signifikanz	< 0,001	„Entlastung“. Keine Früherkennung und keine prophylaktischen Operationen	Keine prädiktive Testung

^aKonsentierter Beschluss des GC-HBOC

neutral, 3 = VUS, 4 = wahrscheinlich pathogen, 5 = pathogen; siehe Tab. 1). Dieser Einteilung liegt ein von David Goldgar et al. (4) entwickeltes statistisches Modell zugrunde, welches verschiedene Untersuchungsstrategien in einem „multifactorial likelihood model“ zusammenführt [4–7]. Dabei sind für *BRCA1* und *BRCA2* insbesondere „co-occurrence“-Analysen zielführend, die auf der Annahme beruhen, dass biallelische, inaktivierende Keimbahnmutationen in den *BRCA1/2*-Genen entweder embryonal letal sind (*BRCA1*) oder zum Phänotyp der Fanconi-Anämie führen (*BRCA2*). Daher erlaubt die Identifikation einer Patientin mit einer pathogenen Mutation in *trans* zu einer VUS die Re-Klassifizierung dieser Variante als neutral. In der Literatur wurden aktuell 2 Fälle von biallelischen *BRCA1*-Mutationsträgerinnen beschrieben [8, 9]. In beiden Fällen führte das Vorliegen einer pathogenen Missense-Mutation in der BRCT (*BRCA1* C-terminal repeat)-Domäne in *trans* zu einer Frameshift-Mutation zu einem neuen Subtyp der Fanco-

ni-Anämie (FA-S), d. h. entgegen der ursprünglichen Annahme können biallelische pathogene *BRCA1*-Mutationen mit dem Überleben vereinbar sein, sind jedoch mit dem FA-S Phänotyp assoziiert. Die Zuverlässigkeit der „co-occurrence“-Analysen bleibt durch diese neuen Erkenntnisse jedoch unberührt. Als weitere Parameter fließen Segregationsanalysen, die Familiengeschichte sowie die Tumorcharakteristika und der Nachweis von „loss of heterozygosity“ (LOH) oder pathogenen Mutationen als „second hit“ im Tumorgewebe in die Analysen ein. Zusätzlich liefern Fall-Kontroll-Studien mit enormen Fallzahlen (iCOGS-Studie, OncoArray-Studie, s. u.) valide Hinweise für oder gegen die Pathogenität einer Sequenzvariante. Das IARC-5-Klassen System ist grundsätzlich für die Klassifizierung von Varianten in allen tumorprädisponierenden Genen geeignet, jedoch sind beispielsweise die klinischen Empfehlungen, welche sich aus Klasse 4- oder 5-Varianten in *BRCA1/2* ergeben, nur bedingt auf die weiteren BC/OC-Risikogene über-

tragbar, da die hierfür nötigen Penetranzdaten bisher noch unzureichend sind. Für *CHEK2* [10] und *PALB2* [11] liegen hier jedoch bereits erste Ergebnisse vor und weitere Follow-up-Studien zur Penetranz von Mutationen in *RAD51C* und *PALB2* mit der Beteiligung des GC-HBOC laufen derzeit oder wurden in Kooperation mit den internationalen Konsortien wie beispielsweise der ENIGMA other genes working group (s. u.) initiiert. Weiterhin sind hier aber auch „co-occurrence“-Analysen denkbar, da beispielsweise der Verlust beider Allele durch homozygote oder compound heterozygote Mutationen in *ATM* zum Phänotyp der Ataxia telangiectasia (AT) führt, wohingegen der Funktionsverlust beider Allele in *NBN* das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) zur Folge hat und z. B. bei *PALB2* und *RAD51C* mit der Fanconi-Anämie einhergeht. Sämtliche Analysen setzen jedoch aufgrund der mehrheitlich seltenen VUS sehr hohe Fallzahlen voraus, die von nationalen Konsortien alleine meist nicht erreicht werden.

Daher werden diese Analysen von den Zentren des GC-HBOC durch zusätzliche funktionelle Untersuchungen zur Klassifizierung der identifizierten Varianten ergänzt. Zum einen sind dies mRNA-Analysen, um mögliche Beeinträchtigungen des Spleißprozesses für fragliche Varianten zu überprüfen. Zum anderen können DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturanalysen (siehe hierzu [12–14]) durchgeführt werden, um zu untersuchen ob beispielsweise der DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismus mittels homologer Rekombination durch die Variante gestört ist und auf fehleranfälligeren Mechanismen wie das Non Homologous End Joining (NHEJ) zurückgegriffen wird.

Das ENIGMA-Konsortium: Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles

Um eine Klassifizierung insbesondere seltener VUS (zunächst in *BRCA1/2*) zu realisieren, wurde 2009 das internationale ENIGMA-Konsortium begründet (enigmaconsortium.org) [15], ein Zusammenschluss von mehr als 100 Wissenschaftlern aus 19 Ländern, welche in insgesamt 7 Ar-

beitsgruppen mittels klinischer, histopathologischer, familienbasierter (Segregationsanalysen) und funktioneller Daten (z. B. Komplementationsassays, Spleißanalysen) und Fall-Kontroll-Studien gemeinsam an einer Klassifizierung von VUS arbeiten. Die nicht öffentliche Datenbank des ENIGMA Konsortiums enthält inzwischen mehr als 3200 distinkte VUS sowie die zugehörigen Daten von mehr als 14.000 Familien. Durch die aktive Beteiligung des GC-HBOC am ENIGMA-Konsortium konnte bereits eine Vielzahl von VUS mit hoher statistischer Sicherheit charakterisiert werden. Zusätzlich wurden etwa 100 VUS des GC-HBOC und 200 VUS des ENIGMA Konsortiums für eine genomweite Assoziationsstudie (OncoArray Studie) nominiert, bei der etwa 80.000 BC-Patientinnen sowie 70.000 Kontrollen genotypisiert werden. Die Ergebnisse dieser GWAS werden im Juli 2015 erwartet und erneut zu einer deutlichen Reduzierung der VUS-Quote führen.

Zentrale Bedeutung kommt der im Jahr 2013 etablierten „other genes working group“ zu, die zur Evaluierung neuer Kandidatengene für den erblichen Brust- und Eierstockkrebs ins Leben gerufen wurde. Im Rahmen dieser Arbeitsgruppe werden die Ergebnisse der Panelanalysen der teilnehmenden Partner projektbasiert zentral gesammelt und ausgewertet. Zusätzlich kooperiert das deutsche Konsortium im Rahmen von mehreren Forschungsvorhaben (PERSPECTIVE/COMPLEXO/BRIDGES) eng mit internationalen Forschungsgruppen, um weitere neue Kandidatengene zu identifizieren, zu evaluieren und funktionell zu charakterisieren.

Bei „variants of unknown significance“ in den Risikogenen *BRCA1* und *BRCA2* handelt es sich mehrheitlich um sehr seltene Mutationen

Aufgrund der genannten Maßnahmen konnte die Häufigkeit der VUS für *BRCA1* und *BRCA2* innerhalb des Konsortiums in den letzten Jahren sukzessive auf heute weniger als 6 % gesenkt werden. Insbesondere rekurrente VUS wurden basierend auf funktionellen und/oder epidemiologischen Analysen als wahrscheinlich pa-

thogen oder als wahrscheinlich neutral klassifiziert. Problematisch erscheinen für *BRCA1* und *BRCA2* insbesondere seltene Sequenzvarianten. In der Tat handelt es sich bei etwa 70 % der in der Datenbank des GC-HBOC verbleibenden *BRCA1/2* VUS, darunter vornehmlich Missense-Mutationen, um sehr seltene Veränderungen. Diese lagen jeweils nur einmal in den insgesamt mehr als 18.000 analysierten BC/OC-Familien vor. Weitere 15 % der VUS wurden konsortiumweit in nur 2 unabhängigen Familien gemeldet. Diese Daten verdeutlichen, dass für die weitere Klassifizierung seltener VUS internationale Kooperationen und zentralisierte Datenbanken zwingend notwendig sind, um gemeinsam eine statistische Aussage über die mögliche Pathogenität einer Variante treffen zu können.

TruRisk™-Paneldiagnostik: Initial ist eine VUS-Quote von etwa 20 % zu erwarten

Für die molekulargenetische Diagnostik des erblichen Brust- und Eierstockkrebses wurde vom deutschen Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs das TruRisk™-Genpanel entwickelt. Dieses 34 Gene umfassende Panel enthält 10 „core genes“ (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *TP53*) sowie 24 weitere Kandidatengene, deren Relevanz für den erblichen BC/OC derzeit im Rahmen von nationalen und internationalen Forschungsprojekten untersucht wird (■ Tab. 2). Bislang liegen Daten von 594 Indexfällen vor, die im Kölner Zentrum mittels des TruRisk™-Genpanels untersucht wurden. Hierbei handelt es sich um 292 nicht nach Familienanamnese selektierte Patientinnen mit triple-negativem Brustkrebs (TNBC) sowie 302 *BRCA1/2*-negative Indexfälle, vorwiegend aus BC/OC-Risikofamilien. In der TNBC-Kohorte ($n=292$) zeigten etwa 18 % der Patientinnen pathogene Veränderungen und weitere 22 % VUS in den „core genes“ inklusive *BRCA1* und *BRCA2*, aber keine zusätzliche pathogene Variante. In der Gruppe der 302 familiären Indexfälle lag die VUS-Quote in den „core genes“ mit etwa 33 % höher. Da es sich hierbei jedoch ausschließlich um *BRCA1/2*-negative Fäl-

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

le handelt, kann hier (bei Berücksichtigung der empirischen Mutationshäufigkeit von etwa 43 % für *BRCA1/2* bei BC/OC-Familien, Engel et al., Manuskript in Vorbereitung) eine VUS-Quote von etwa 19 % in allen BC/OC-Familien extrapoliert werden. Etwa 80 % der Patientinnen mit einem VUS-Bericht trugen genau eine VUS. Erwartungsgemäß zeigten sich die meisten VUS im *ATM*-Gen, welches mit 63 Exons und einer codierenden Sequenz von 9,2 kb das größte der untersuchten Gene darstellt.

Klassifizierung von VUS in „non-*BRCA1/2*“-Genen

Die Ergebnisse dieser Pilotstudie mit dem TruRisk™-Genpanel zeigen, dass durch die Einführung der Panelanalyse als Routinediagnostik im GC-HBOC die VUS-Quote zunächst ansteigen wird. Allerdings wird durch die systematische Klassifizierung innerhalb des Konsortiums, die Dokumentation der gefundenen Varianten in der internen, zentralen Leipziger Datenbank sowie insbesondere durch die Zusammenarbeit mit den internationalen Kooperationspartnern (ENIGMA, PERSPECTIVE, BRIDGES) zukünftig eine schnelle und zuverlässige Klassifizierung vieler VUS in den neuen BC/OC-Risikogenen erfolgen können. Innerhalb des deutschen Konsortiums wurde festgelegt, dass alle Varianten von den Zentren einheitlich bewertet werden sollen und Patientinnen über Neubewertungen zeitnah informiert werden. Um dies zu gewährleisten, wurde eine Expertengruppe (VUS-Task-Force) gebildet, welche monatlich die Klassifizierung der neu gemeldeten Varianten überprüft und ggf. Neubewertungen vornimmt. Sie meldet die Klassifizierungen an die interne Datenbank in Leipzig, gefolgt von einer zeitnahen Benachrichtigung aller Zentren des Konsortiums, die Patientinnen mit entsprechenden Veränderungen betreuen. Insgesamt ermöglicht dieses System die Mitteilung einer überprüften Neubewertung an die betroffenen Patientinnen innerhalb weniger Wochen.

medgen 2015 · 27:211–216 DOI 10.1007/s11825-015-0049-z
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

J. Hauke · C. Engel · B. Wappenschmidt · C.R. Müller · E. Hahnen

Klassifizierung von „variants of unknown significance“ (VUS) beim familiären Brust- und Eierstockkrebs

Zusammenfassung

Die Anwendung von NGS-basierten Verfahren in der molekulargenetischen Diagnostik wird in den nächsten Jahren zur Identifikation einer Vielzahl von Varianten mit unklarer Signifikanz (VUS) führen, deren Relevanz für den untersuchten Phänotyp bestimmt werden muss. In der Diagnostik erblicher Tumorpredispositionserkrankungen wird die VUS-Klassifizierung insbesondere in *non-BRCA1/2*-Genen in den nächsten Jahren einen hohen Stellenwert einnehmen, eine Herausforderung, die jedoch insbesondere durch internationale wissenschaftliche Kooperationen bewältigt werden kann. Das Deutsche Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs (GC-HBOC) verwendet zur Klassifikation dieser Varianten das international etablierte IARC

5-Klassen-System und kooperiert zur Bewertung seltener Varianten sowie Varianten in bislang weniger gut untersuchten Genen mit zahlreichen internationalen Konsortien und Forschungsgruppen. Vorhersageprogramme können im Kontext von Forschungsprojekten ein nützliches Werkzeug bei der Bewertung beispielsweise der großen Zahl von Varianten in NGS-basierten Untersuchungen sein. Im Rahmen der molekulargenetischen Diagnostik sollte die Klassifizierung der identifizierten Varianten jedoch nicht ausschließlich aufgrund der Vorhersageprogramme erfolgen.

Schlüsselwörter

VUS · Vorhersageprogramme · Klassifizierung · Mutation · Panelanalyse

Classification of variants of unknown significance (VUS) in hereditary breast and ovarian cancer

Abstract

In the coming years, procedures based on next-generation sequencing (NGS) in genetic routine diagnostics will lead to a tremendous increase in the number of identified variants of unknown significance (VUS) whose relevance for the analysed phenotype has to be determined. Classification of VUS, especially in *non-BRCA1/2* genes, will become one of the key challenges in diagnostics of hereditary tumor predisposition disorders. These can be overcome by international scientific cooperation. Therefore, the German consortium of hereditary breast and ovarian cancer (GC-HBOC) applies the internationally accepted IARC 5-class system and coop-

erates with numerous international consortia and working groups for the classification of infrequent variants and variants in new risk genes. Prediction programs can be valuable tools for classification of variants especially in the context of NGS-based research projects dealing with large amounts of data. In a diagnostic setting, the classification of variants should not be solely based on *in-silico* prediction tools.

Keywords

VUS · Prediction tools · Classification · Mutation · Panel analysis

Verwendung von Vorhersageprogrammen für die Klassifizierung von VUS

Im Kontext von Forschungsprojekten stellen Vorhersageprogramme (■ Tab. 3) ein wichtiges Werkzeug dar, um einen Eindruck über die mögliche funktionelle Bedeutung von gefundenen Sequenzvarianten zu erlangen. Zu den für die Bewertung von *BRCA1/2* Missense-Varianten am häufigsten verwendeten „prediction tools“ zählen PolyPhen-2 [16], SIFT [17], MutationTaster2 [18, 19] und Align-

GVGD [20]. Der Anteil korrekt klassifizierter Vorhersagen der Programme wird mit 70–75 % angegeben [21]. Um diese Ergebnisse bzgl. der Vorhersage in den *BRCA*-Genen zu überprüfen, wurden von uns 202 bereits eindeutig klassifizierte Missense-Varianten aus der Datenbank des GC-HBOC mittels Batch-Abfrage durch die oben genannten Prediction Tools bewertet. Dabei handelte es sich um 49 pathogene sowie 153 neutrale Missense-Varianten, die mittels funktionseller und/oder multifaktorieller Untersuchungen bereits eindeutig klassifiziert

Tab. 2 Transkriptvarianten der 10 „core genes“ des TruRisk™-Genpanels des deutschen Konsortiums

Gen	NCBI Accession No.	Ensembl Transkript Variante	Exons	Aminosäuren	Größe (codierende Sequenz)
ATM	NM_000051.3	ENST00000278616	63	3056	9171 bp
BRCA1	NM_007294.3	ENST00000357654	23	1863	5592 bp
BRCA2	NM_000059.3	ENST00000544455	27	3418	10257 bp
CDH1	NM_004360.3	ENST00000261769	16	882	2649 bp
CHEK2	NM_007194.3	ENST00000328354	15	543	1632 bp
NBN	NM_002485.4	ENST00000265433	16	754	2265 bp
PALB2	NM_024675.3	ENST00000261584	13	1186	3561 bp
RAD51C	NM_058216.2	ENST00000337432	9	376	1131 bp
RAD51D	NM_002878.3	ENST00000345365	10	328	987 bp
TP53	NM_000546.5	ENST00000269305	11	393	1182 bp

Tab. 3 Liste der verwendeten Vorhersageprogramme

Vorhersageprogramm	Referenz	URL
Align-GVGD	Tavtigian, Deffenbaugh et al. [20]	http://agvgd.iarc.fr/
MutationTaster2	Schwarz, Cooper et al. [18]	http://mutationtaster.org/
SIFT	Ng and Henikoff [17]	http://sift.jcvi.org/
PolyPhen-2	Adzhubei, Schmidt et al. [16]	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
MaxEntScan	Yeo and Burge [23]	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoresEq.html
HSF	Desmet, Hamroun et al. [24]	http://umd.be/HSF/

werden konnten. Es zeigte sich, dass die Programme sich bezüglich der Sensitivität und Spezifität deutlich unterscheiden. So zeigten sich beim MutationTaster2 eine hohe Sensitivität (95 %) und mit 23 % eine relativ geringe Falsch-Positiv-Quote. Die Sensitivität von PolyPhen-2 und Align-GVGD lag deutlich niedriger, wobei PolyPhen-2 als einziges Programm die sehr häufig vorkommende pathogene Mutation c.181T > G; p.Cys61Gly in *BRCA1* als neutral einstufte. Diese Mutation wurde bislang in 277 Familien des deutschen Konsortiums bei insgesamt 458 Patienten nachgewiesen. Auch die Falsch-Positiv-Quote dieser Programme war mit 16 bzw. 33 % vergleichbar zum MutationTaster2. Die höchste Sensitivität zeigte SIFT (100 %), was jedoch mit einer sehr hohen Falsch-Positiv-Quote von 53 % einherging. Insgesamt 15 der eindeutig neutralen Missense-Varianten wurden von allen vier Programmen als pathogen eingestuft. Diese vorläufigen Analysen zeigen eindrücklich, dass die Klassifizierung von Sequenzvarianten im Rahmen der molekulargenetischen Diagnostik keinesfalls allein auf Vorhersageprogrammen beruhen sollte. So äußerte sich unter

anderem der Mitautor von PolyPhen-2, Shamil Sunyaev [22], selbst überaus kritisch über die Verwendung der Vorhersageprogramme in der klinischen Beurteilung von Missense-Varianten: „Even if algorithms were 100 % accurate, knowing that a variant causes a protein to lose function is a very long way from knowing whether it contributes to disease [...] The effects of loss-of-function mutations can be surprisingly minimal, buffered by redundancies in cellular machinery. Algorithms alone are certainly not good enough for clinical diagnostics [...] some clinicians are starting to take an interest in these scores. This is how I lose sleep at night“. (Shamil Sunyaev, Mitautor von PolyPhen-2 zum Umgang mit Prediction Tools 2012 in Nature [22].)

Eine weitere Herausforderung stellt die Klassifizierung von potenziellen Spleißvarianten dar. Auch hierfür stehen verschiedene Algorithmen zur Verfügung (■ Tab. 3), zu den geläufigsten zählen unter anderem MaxEntScan [23] und Human Splicing Finder (HSF, Version 2.4.1) [24]. Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit dieser beiden Programme bei intronischen Veränderungen außer-

halb der invarianten Spleißstellen wurden die derzeit in der Datenbank des GC-HBOC gemeldeten pathogenen Spleißvarianten und neutrale intronische Varianten in den Genen *BRCA1/2* untersucht. Hierbei wurden Varianten in exonflankierenden Bereichen mit einem Abstand von 3 bis 15 Nukleotiden zur Exongrenze hin berücksichtigt ($n = 42$). Die Klassifizierung der Spleißvarianten erfolgte dabei durch eigene oder durch andere Forschungsgruppen publizierte mRNA-Analysen. Bei der Analyse der 17 eindeutig pathogenen Varianten sagte MaxEntScan eine Beeinflussung der Donor- oder Akzeptorspleißstelle zuverlässig bei allen 17 Varianten voraus, während mittels HSF nur bei 9 der 17 Varianten eine korrekte Einstufung erfolgte. Bei den 25 neutralen Veränderungen wurde nur eine Veränderung von MaxEntScan als potenziell spleißogen eingestuft, bei HSF hingegen keine. MaxEntScan stellt somit bei den hier untersuchten intronischen Veränderungen – wie auch schon von Wappenschmidt et al. 2012 gezeigt – das zuverlässigste Vorhersageprogramm dar [25]. Die Vorhersage der Effekte von exonischen Varianten auf das Spleißen ist hingegen weit weniger zuverlässig. So konnten von den 6 in der Publikation untersuchten exonischen Varianten nur der Effekt von jeweils 3 Varianten durch MaxEntScan bzw. HSF richtig vorhergesagt werden. Auch hier zeigt sich, dass die Vorhersageprogramme abweichende Ergebnisse liefern. Daher sollten die Ergebnisse eines oder mehrerer Vorhersageprogramme nicht zur alleinigen Klassifizierung einer Variante im Rahmen der Diagnostik verwendet werden, sondern nur als Grundlage für die Entscheidung dienen, ob weitere mRNA-Analysen durchgeführt werden sollten. Im Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs wurde festgelegt, dass eine RNA-Analyse für den Bereich der invarianten Spleißstelle sowie den Bereich -3/+6 im Intron zur eindeutigen Klassifizierung der Variante im Rahmen der Diagnostik obligat ist. Die Durchführung und Bewertung der Spleißanalysen erfolgt dabei nach den Empfehlungen der IARC und des ENIGMA-Konsortiums [26–28].

Fazit für die Praxis

Die NGS-basierte Diagnostik von bislang weniger gut untersuchten Genen erfordert eine standardisierte und strukturierte Klassifizierung der VUS. Im Deutschen Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs basiert die Klassifizierung auf dem IARC 5-Klassen-System. Sie berücksichtigt Daten zu Frequenz, „co-occurrence“, Segregation, Spleißen und Histopathologie sowie funktionelle und klinische Daten. Zusätzlich gewinnen Daten aus internationalen Fall-Kontroll-Studien und Konsortien zunehmend an Bedeutung. Durch die so geschaffenen Strukturen und Kooperationen konnten bereits viele Varianten in *BRCA1/2* eindeutig klassifiziert und die zunächst noch hohe VUS-Quote in weiteren Panelgenen schnell gesenkt werden. Im Rahmen von gendiagnostischen Untersuchungen sollte die Klassifizierung von identifizierten Varianten nicht ausschließlich auf Grundlage von Vorhersageprogrammen erfolgen.

Korrespondenzadresse

Dr. rer. nat. J. Hauke

Zentrum Familiärer Brust- und Eierstockkrebs
Universitätsklinikum Köln
Kerpener Straße 34, 50931 Köln
jan.hauke@uk-koeln.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. PD Dr. Eric Hahnen weist auf folgende Beziehung hin: Er erhielt Honorare für die Teilnahme an Scientific Advisory Board Treffen der Firma AstraZeneca. Jan Hauke, Christoph Engel, Barbara Wappenschmidt und Clemens R. Müller geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Alle im vorliegenden Manuskript beschriebenen Untersuchungen am Menschen wurden mit Zustimmung der zuständigen Ethik-Kommission, im Einklang mit nationalem Recht sowie gemäß der Deklaration von Helsinki von 1975 (in der aktuellen, überarbeiteten Fassung) durchgeführt. Von allen beteiligten Patienten liegt eine Einverständniserklärung vor.

Literatur

1. Romero A, Garcia-Garcia F, Lopez-Perollo I, Ruiz de Garibay G, Garcia-Saenz JA, Garre P, Ayllon P, Benito E, Dopazo J, Diaz-Rubio E et al (2015) *BRCA1* alternative splicing landscape in breast tissue samples. *BMC Cancer* 15:219

2. Yang R, Chen B, Hemminki K, Wappenschmidt B, Engel C, Sutter C, Ditsch N, Weber BH, Niederacher D, Arnold N et al (2009) Polymorphisms in *BRCA2* resulting in aberrant codon-usage and their analysis on familial breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 118(2):407–413
3. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, Hogervorst FB, Hoogerbrugge N, Spurdle AB, Tavtigian SV et al (2008) Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 29(11):1282–1291
4. Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, Monteiro AN, Tavtigian SV, Couch FJ, Breast Cancer Information Core Steering C (2004) Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to *BRCA1* and *BRCA2*. *Am J Hum Genet* 75(4):535–544
5. Easton DF, Deffenbaugh AM, Pruss D, Frye C, Wustrup RJ, Allen-Brady K, Tavtigian SV, Monteiro AN, Iversen ES, Couch FJ et al (2007) A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the *BRCA1* and *BRCA2* breast cancer-predisposition genes. *Am J Hum Genet* 81(5):873–883
6. Goldgar DE, Easton DF, Byrnes GB, Spurdle AB, Iversen ES, Greenblatt MS, Group IUGVW (2008) Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Human Mutat* 29(11):1265–1272
7. Spurdle AB (2010) Clinical relevance of rare germline sequence variants in cancer genes: evolution and application of classification models. *Curr Opin Genet Dev* 20(3):315–323
8. Domchek SM, Tang J, Stopfer J, Lilli DR, Hamel N, Tischkowitz M, Monteiro AN, Messick TE, Powers J, Yonker A et al (2013) Biallelic deleterious *BRCA1* mutations in a woman with early-onset ovarian cancer. *Cancer Discov* 3(4):399–405
9. Sawyer SL, Tian L, Kahkonen M, Schwartzentruber J, Kircher M, University of Washington Centre for Mendelian G, Consortium FC, Majewski J, Dymant DA, Innes AM et al (2015) Biallelic mutations in *BRCA1* cause a new fanconi anemia subtype. *Cancer Discov* 5(2):135–142
10. Cybulski C, Wokolorczyk D, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Masojc B, Deebniak T, Gorski B, Blecharz P et al (2011) Risk of breast cancer in women with a *CHEK2* mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol* 29(28):3747–3752
11. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pytkas K, Roberts J, Lee A, Subramanian D, De Leeneer K, Fostira F et al (2014) Breast-cancer risk in families with mutations in *PALB2*. *N Engl J Med* 371(6):497–506
12. Keimling M, Deniz M, Varga D, Stahl A, Schrezenmeier H, Kreienberg R, Hoffmann I, König J, Wiesmuller L (2012) The power of DNA double-strand break (DSB) repair testing to predict breast cancer susceptibility. *FASEB J* 26(5):2094–2104
13. Keimling M, Volcic M, Csernok A, Wieland B, Dork T, Wiesmuller L (2011) Functional characterization connects individual patient mutations in ataxia telangiectasia mutated (*ATM*) with dysfunction of specific DNA double-strand break-repair signaling pathways. *FASEB J* 25(11):3849–3860
14. Millot GA, Carvalho MA, Caputo SM, Vreeswijk MP, Brown MA, Webb M, Rouleau E, Neuhausen SL, Hansen T, Galli A et al (2012) A guide for functional analysis of *BRCA1* variants of uncertain significance. *Hum Mutat* 33(11):1526–1537
15. Spurdle AB, Healey S, Devereau A, Hogervorst FB, Monteiro AN, Nathanson KL, Radice P, Stoppa-Lyonnet D, Tavtigian S, Wappenschmidt B et al (2012) ENIGMA—evidence-based network for the interpretation of germline mutant alleles: an international initiative to evaluate risk and clinical significance associated with sequence variation in *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Hum Mutat* 33(1):2–7
16. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7(4):248–249
17. Ng PC, Henikoff S (2003) SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31(13):3812–3814
18. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods* 11(4):361–362
19. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D (2010) MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature Methods* 7(8):575–576
20. Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, de Silva D, Zharkikh A, Thomas A (2006) Comprehensive statistical study of 452 *BRCA1* missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet* 43(4):295–305
21. Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M (2011) Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Hum Mutat* 32(4):358–368
22. Baker M (2012) Functional genomics: the changes that count. *Nature* 482(7384):257, 259–262
23. Yeo G, Burge CB (2004) Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 11(2–3):377–394
24. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C (2009) Human splicing finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37(9):e67
25. Wappenschmidt B, Becker AA, Hauke J, Weber U, Engert S, Kohler J, Kast K, Arnold N, Rhiem K, Hahnen E et al (2012) Analysis of 30 putative *BRCA1* splicing mutations in hereditary breast and ovarian cancer families identifies exonic splice site mutations that escape in silico prediction. *PLoS One* 7(12):e50800
26. Whitley PJ, de la Hoya M, Thomassen M, Becker A, Brandao R, Pedersen IS, Montagna M, Menendez M, Quiles F, Gutierrez-Enriquez S et al (2014) Comparison of mRNA splicing assay protocols across multiple laboratories: recommendations for best practice in standardized clinical testing. *Clin Chem* 60(2):341–352
27. de Garibay GR, Acedo A, Garcia-Casado Z, Gutierrez-Enriquez S, Tosar A, Romero A, Garre P, Llorca G, Thomassen M, Diez O et al (2014) Capillary electrophoresis analysis of conventional splicing assays: IARC analytical and clinical classification of 31 *BRCA2* genetic variants. *Hum Mutat* 35(1):53–57
28. Spurdle AB, Couch FJ, Hogervorst FB, Radice P, Sinilnikova OM (2008) Prediction and assessment of splicing alterations: implications for clinical testing. *Hum Mutat* 29(11):1304–1313