

Rīgas Stradiņa universitāte
Medicīnas fakultāte
Akadēmiskā maģistra studiju programma
“Biomedicīna”

MAĢISTRA DARBS

***BRCA1* un *BRCA2* variantu analīze Latvijas populācijā: nākamās
paaudzes sekvenčēšanas pieeja**

Darba autore:

Anneta Kļujeva

Studenta apliecības Nr. 23-063055

/paraksts/

2025. gada 1.junijs

Darba vadītāja:

Zanda Daneberga

Dr. med., profesore

RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra

/paraksts/

2025. gada 1.junijs

Rīga, 2025

Kopsavilkums

Maģistra darba mērķis ir noteikt *BRCA1* un *BRCA2* variantu īpatsvaru starp onkoloģiski veselām sievietēm Latvijas populācijā, izmantojot nākamās paaudzes sekvenčēšanas (NGS) tehnoloģiju.

Darbā apkopota literatūra par pārmantotu krūts un olnīcu vēzi, augstas penetrances *BRCA1* un *BRCA2* gēnu raksturojumu, mērķtiecīgas sekvenčēšanas pieeju, kā arī apskatīta ģenētisko variantu klasifikācija un interpretācija saskaņā *BRCA1* un *BRCA2* gēnu specifiskām vadlīnijām.

RSU Onkoloģijas un molekulārās ģenētikas institūta veiktajā pētījumā iesaistīja onkoloģiski veselus dalībniekus (n=538), kuri nodeva siekalu paraugu ar mērķi veikt *BRCA1* un *BRCA2* gēnu analīzi. No bioloģiskā materiāla izdalīja DNS, sagatavoja nākamās paaudzes sekvenčēšanas bibliotēkas un veica to sekvenčēšanu. Kvalitātes kontrolei, sekvenču un kopiju skaita variācijas (CNV) analīzei izmantoja *CLC Genomics Workbench* bioinformātikas rīku, kur iegūti varianti pamatā tika klasificēti balstoties uz ENIGMA konsorcijs ekspertu varianta interpretāciju un publiski pieejamu informāciju par variantu citās datubāzes. Klasificēti klīniski nozīmīgi ģenētiski varianti validēti ar “zelta” standarta metodi Sangera sekvenčēšanu, identificētas lielas strukturālas izmaiņas pārbaudītas ar multipleksa ligācijas atkarīgo provju amplifikācijas (MLPA) metodi. Katra identificēta varianta sastopamība pētījumā apkopota, izmantojot *RStudio* statistisko datu analīzes rīku.

Identificēti un klasificēti septiņi klīniski nozīmīgi varianti *BRCA1* un *BRCA2* gēnos un viena klīniski nozīmīga liela strukturāla izmaiņa *BRCA1* gēnā. Kā arī, salīdzināta *BRCA1* un *BRCA2* labdabīgu variantu sastopamība ar publiski pieejamiem varianta biežuma datiem no Igaunijas, Korejas, Somijas, Nīderlandes, Zviedrijas, Japānas un Spānijas populācijas. Rezultātā Latvijas populācijā identificēto variantu biežumam novērota tuvāka līdzība ar Igaunijas populāciju.

Atslēgvārdi: *BRCA1*, *BRCA2*, pārmantots krūts un olnīcu vēzis, nākamās paaudzes sekvenčēšana (NGS)

Summary

The aim of the Master's thesis is to determine the proportion of *BRCA1* and *BRCA2* variants among oncological healthy women in the Latvian population using next-generation sequencing (NGS) technology.

The thesis reviews the literature on hereditary breast and ovarian cancer, characterisation of high penetrance *BRCA1* and *BRCA2* genes, targeted sequencing approach, and classification and interpretation of genetic variants according to *BRCA1* and *BRCA2* gene-specific guidelines.

The study, performed by the RSU Institute of Oncology and Molecular Genetics, involved oncological healthy participants (n=538) who provided a saliva sample for *BRCA1* and *BRCA2* gene analysis. DNA was extracted from the biological material, next generation sequencing libraries were prepared and sequenced. The CLC Genomics Workbench bioinformatics tool was used for quality control, sequence and copy number variation (CNV) analysis, where the resulting variants were basically classified on the basis of the ENIGMA consortium experts' interpretation of the variant and publicly available information about the variant in other databases. Classified clinically significant genetic variants were validated by the “gold” standard method Sanger sequencing, identified major structural changes were verified by multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). The frequency of each identified variant in the study was summarized using the RStudio statistical data analysis tool.

Seven clinically significant variants in the *BRCA1* and *BRCA2* genes and one clinically insignificant major structural change in the *BRCA1* gene were identified and classified. In addition, the incidence of benign variants in *BRCA1* and *BRCA2* was compared with publicly available variant frequency data from Estonian, Korean, Finnish, Dutch, Swedish, Japanese and Spanish populations. As a result, the frequency of variants identified in the Latvian population is more similar to the Estonian population.

Keywords: *BRCA1*, *BRCA2*, hereditary breast and ovarian cancer, next-generation sequencing (NGS)

SATURS

IEVADS.....	5
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1. Krūts un olnīcu vēža vispārīgs raksturojums.....	7
1.1.1. Pārmantots krūts un olnīcu vēzis	7
1.1.2. <i>BRCA1/2</i> gēnu raksturojums	8
1.2. Nākamās paaudzes sekvencēšanas tehnoloģija	10
1.2.1. Mērķtiecīga sekvencēšana	10
1.3. Ģenētisko variāciju klasifikācija un interpretācija	12
1.3.1. Patogenitātes kritēriju apraksts.....	13
1.3.2. Labdabīguma kritēriju apraksts	15
1.3.3. <i>BRCA1</i> un <i>BRCA2</i> vadlīnijas.....	16
2. MATERIĀLI UN METODES.....	18
2.1. Eksperimenta dizains	18
2.2. Pētījuma dalībnieki un paraugi	18
2.3. Paraugu sagatavošana bibliotēkas izveidei.....	20
2.3.1. DNS fragmentēšana un fragmentu galu sagatavošana	20
2.3.2. Adapteru ligēšana	21
2.3.3. Targeted Enrichment (pavairošanas) reakcija	22
2.3.4. Indeksu piesaiste.....	22
2.3.5. Izveidotu bibliotēku kvalitātes kontrole	24
2.4. Bibliotēku normalizēšana	24
2.4.1. Bibliotēkas modifikācija.....	24
2.4.2. Modificētas bibliotēkas normalizēšana	25
2.5. Paraugu DNS sekvencēšana	26
2.6. Datu apstrāde un analīze.....	26
2.7. Variantu interpretācija	27
2.8. Patogēnu variantu validācija.....	27
2.9. Datu statistiskā analīze	29
3. PĒTĪJUMA REZULTĀTI.....	31
3.1. DNS bibliotēku sagatavošana un sekvencēšana	31
3.2. Variantu identificēšana un klasificēšana	32
3.3. <i>BRCA1</i> un <i>BRCA2</i> variantu sastopamība un salīdzinājums ar citām populācijām....	37
DISKUSIJA	38
SECINĀJUMI	42
PATEICĪBAS	43
IZMANTOTIE LITERATŪRAS AVOTI.....	44

Jēdzienu un saīsinājumu saraksts

DNS	dezoksiribonukleīnskābe
RNS	ribonukleīnskābe
HBOC	pārmantots krūts un olnīcu vēzis (ang. v. <i>Hereditary breast and ovarian cancer</i>)
SNV	viena nukleotīda nomaiņas variants (ang. v. <i>Single Nucleotide Variant</i>)
MLPA	multipleksa ligācijas atkarīgo provju amplifikācija (ang. v. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>)
BRCA1, BRCA2	krūts vēža gēns 1, 2 (ang.v. <i>breast cancer gene 1, 2</i>)
NGS	nākamās paaudzes sekvenčēšana (ang.v. <i>Next-generation sequencing</i>)
PĶR	polimerāzes ķēdes reakcija
VUS	variants ar neskaidru nozīmi (ang. v. <i>Variant of Uncertain Significance</i>)
FFPE	formalīnā fiksētas un parafīnā iegultas vielas (angl. v. <i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>)
HRR	homoloģiskās rekombinācijas labošana (angl. v. <i>Homologous Recombination Repair</i>)
WGS	pilna genoma sekvenčēšana (angl. v. <i>Whole-genome sequencing</i>)
WES	pilna eksoma sekvenčēšana (angl. v. <i>Whole-exome sequencing</i>)
VCEP	variantu kuratoru ekspertu grupas (angl. v. <i>Variant Curation Expert Panel</i>)
TS	mērķtiecīga sekvenčēšana (angl. v. <i>Targeted Sequencing</i>)

IEVADS

Katru gadu ap 2,3 miljoni cilvēku tiek diagnosticēti krūts vēzis, kas ir biežākais ļaundabīgais audzējs sievietēm [9;86]. Saskaņā ar GLOBOCAN 2022. gadā tika reģistrēti 666103 nāves gadījumi no krūts vēža, kas sievietēm ir 15,4% no vēža saistītiem nāves gadījumiem [9]. Lai gan olnīcu vēzis ir retāk sastopams, tas ir saistīts ar augstu mirstību, jo diagnosticēts vēlīnā stadijā, un veido 5 % no visiem ar vēzi saistītajiem nāves gadījumiem [73]. Latvijā katru gadu pirmreizēji reģistrē krūts vēzi ap 1100 sievietēm un olnīcu vēzi ap 240 sievietēm, kas pēc vecuma standartizētiem saslimstības rādītājiem ir augstāk nekā vidēji Eiropas Savienībā (ES) un veido ievērojamu veselības aprūpes slogu [73].

Neskatoties uz to, ka lielākā daļa no krūts un olnīcu vēža saslimšanas gadījumiem ir sporādiskie, aptuveni 5-10% krūts audzēju un 10-15% olnīcu audzēju ir pārmantoti [58;59;86]. Visbiežāk pārmantots krūts un olnīcu vēzis ir saistīts ar augstas penetrances gēniem *BRCA1* un *BRCA2*, kas ir nozīmīgi vēža ģenētiskā riska novērtēšanā [6;26;37;49]. Populācijā risks saslimst ar krūts vēzi dzīves laikā ir ap 12% un ar olnīcu vēzi aptuveni 1-2% [59]. Sievietēm ar pārmantoto patogēno variantu *BRCA1* vai *BRCA2* gēnā šis risks saslimst līdz 70 gadiem sasniedz 55-72% vai 45-69% krūts vēža gadījumā un 39-44% vai 11-17% olnīcu vēža gadījumā [59].

BRCA1/BRCA2 gēni ir 110 kb un 84 kb gari proteīnus kodējošā DNS [64]. Pēc *ClinVar* datubāzes datiem *BRCA1* gēnā reģistrēti ap 4300 un *BRCA2* gēnā ap 5400 patogēnu vai ticami patogēnu variantu. Vēsturiski "zelta" standarta noteikšanas metode viena nukleotīda nomaiņu (SNV) vai mazas delēcijas/insercijas noteikšanai ir Sanger sekvencēšana, kas ir augstas precizitātes, bet laikietilpīga un dārga metode lielu gēnu analīzei [28]. Multipleksa ligācijas atkarīgo provju amplifikācijas (MLPA) metode pielietota strukturālās variācijas duplikācijas/delēcijas jeb kopiju skaita variantu (CNV) noteikšanā, bet ar to nav iespējams noteikt nelielas bāzu pāru insercijas un delēcijas un nav efektīvi priekš SNV variantu noteikšanai [28;39]. Mūsdienās ģenētiskā testēšanā arvien plašāk tiek izmantota nākamās paaudzes sekvencēšanas (NGS) tehnoloģija, kuras priekšrocības ir iespēja sekvencēt vairākus gēnus un lielu paraugu skaitu vienlaicīgi, detektēt ar augstu precizitāti gan SNV, gan mazas delēcijas/insercijas, gan CNV [28;68;70;80].

Latvijā *BRCA1/BRCA2* variantu testēšanas vadlīnijas galvenokārt koncentrējas uz augsta riska grupām - sievietēm ar ģimenes anamnēzi vai jau diagnosticētu krūts vai olnīcu audzēju līdz 50 gadiem [4]. Bieži vien, *BRCA1/BRCA2* pozitīvie krūts un olnīcu vēža gadījumi diagnosticēti jau vēlākās stadijās [47;73]. Tas norāda uz to, ka lielāka daļa no *BRCA1/BRCA2*

patogēnā varianta nēsātājiem palika neatpazīsti, jo daudzi cilvēki bez zināmas vai nepilnas ģimenes vēstures var nebūt iekļauti testēšanas programmā [83].

Iepriekš Latvijā bija izpētītie patogēnie varianti *BRCA1/BRCA2* gēnos cilvēkiem, kuriem diagnosticēts krūts un olnīcu vēzis [6;25;47;78]. Izmantojot NGS tehnoloģiju ir iespēja analizēt visus *BRCA1* un *BRCA2* variantus Latvijas populācijā un detektēt ne tikai patogēnus variantus, kuri iepriekš bija novēroti populācijā, bet arī jaunus variantus [13;15;18;26;40;90].

Darba mērķis:

Noteikt *BRCA1* un *BRCA2* variantu īpatsvaru starp onkoloģiski veselām sievietēm Latvijas populācijā, izmantojot nākamās paaudzes sekvencēšanas (NGS) tehnoloģiju.

Hipotēze:

NGS tehnoloģijas pielietošana onkoloģiski veselām sievietēm ļauj savlaicīgi identificēt augstu krūts un olnīcu vēža risku.

Uzdevumi:

1. Identificēt un klasificēt klīniski nozīmīgus ģenētiskos variantus, izmantojot bioinformātikas rīkus un datubāzes.
2. Identificēt un klasificēt klīniski nozīmīgas lielās strukturālas izmaiņas *BRCA1* un *BRCA2* gēnos, izmantojot bioinformātikas rīkus un datubāzes.
3. Novērtēt *BRCA1* un *BRCA2* variantu sastopamību analizētajā grupā un salīdzināt to ar citām populācijām.

1.LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Krūts un olnīcu vēža vispārīgs raksturojums

Krūts vēzis tiek diagnosticēts ap 2,3 miljoniem cilvēku katru gadu. Krūts vēzis ir visbiežākais ļaundabīgais audzējs sievietēm, kas 2022. gadā bija nāves cēlonis 666103 gadījumos un izveido 15,4% ar vēzi saistītiem nāves gadījumiem visā pasaulē [9]. Savukārt, olnīcu vēzis ir retāk sastopams, bet ir saistīts ar augstu mirstību un veido 5% ar vēzi saistītajiem nāves gadījumiem, jo diagnosticēts vēlīnā stadijā [65;85].

Latvijā pēc pēdējiem pieejamiem datiem 2023. gadā ar krūts vēzi pirmreizēji diagnosticē 1153 sievietēm un 1 vīrietim, bet ar olnīcu vēzi 243 sievietēm [73]. Lielākā daļa no krūts un olnīcu vēža saslimšanas gadījumiem ir sporādiski un visbiežāk vērojami sievietēm vecumā virs 50 gadiem, bet aptuveni 5-10% krūts audzēju un 10-15% olnīcu audzēju ir pārmantoti, kas skar arī jaunākās sievietes [10;59]. Turklāt, pēc statistikas starp pirmreizēji diagnosticētām sievietēm ar krūts un olnīcu vēzi 19% un 21,8% ir sievietes vecumā līdz 50 gadiem [73].

Agrīna diagnostika ir viens no svarīgākajiem faktoriem, lai uzlabotu vēža ārstēšanas efektivitāti un palielinātu pacientu izdzīvošanas iespējas. Latvijā katru gadu vidēji 25% no krūts vēža gadījumiem un 49% no olnīcu vēža gadījumiem tiek diagnosticēti vēlīnā stadijā (III-IV) [73].

1.1.1. Pārmantots krūts un olnīcu vēzis

Pārmantots krūts un olnīcu vēzis (HBOC) ir autosomāli dominanti pārmantotais sindroms, kas saistīts ar paaugstinātu risku saslimst ar krūts un/vai olnīcu vēzi dzīves laikā [4;5;89]. Sievietēm ar HBOC ir ne tikai predispozīcija saskarties ar ļaundabīgu audzēju agrākā vecumā, bet arī lielāka varbūtība atkārtoti saslimst ar vēzi [49]. Vīriešiem šis sindroms biežāk saistīts ar paaugstinātu prostatas un krūts vēža risku [19].

HBOC bieži vien izraisa patogēni varianti *BRCA1* vai *BRCA2* gēnos ar augsto penetranci, kas sastopams 0,2-0,3% populācijā, tomēr ir zināms, ka Austrumeiropas izcelsmes Aškenazi ebreju tautības populācijai prevalence ir izteikti augstāka un sasniedz līdz 2,5% (1 no 40) [58; 62]. Populācijā risks saslimst ar krūts vēzi ir aptuveni 12% un ar olnīcu vēzi ir aptuveni 1-2% [5;29;59]. Patogēna varianta nēsātājiem *BRCA1* gēnā risks saslims ar krūts vēzi līdz 70 gadiem ir augstāks un sasniedz līdz 55-72% un 39-44% olnīcu vēža gadījumā, bet varianta nēsātājiem *BRCA2* gēnā šis risks paaugstinājās līdz 45-69 % un 11-17 % [41; 59].

Pārmantots krūts un olnīcu vēzis ir saistīts ne tikai ar *BRCA1* un *BRCA2* gēniem, bet arī ar citiem retāk sastopamiem gēniem, kuri arī ir iekļauti HBOC diagnosticēšanas panelī [1;79]. Pie

augstas un vidējās penetrances gēniem pieder *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *CHEK2*, *ATM* un *BARD1* [51].

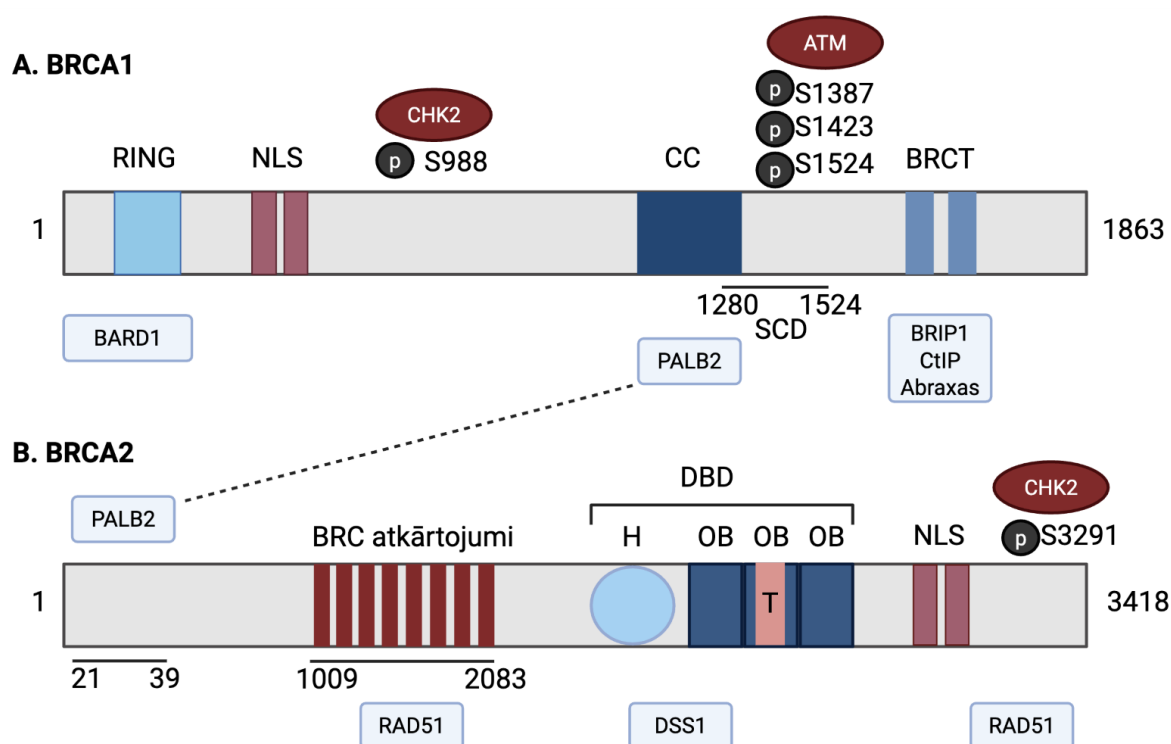
1.1.2. *BRCA1/2* gēnu raksturojums

Katru dienu DNS spontāni notiek izmaiņas un bojājumi, ko izraisa tādi faktori kā jonizējošais starojums, UV starojums, dažādi ķīmiskie vai bioloģiskie aģenti utt., tāpēc DNS labošanas procesam ir izšķiroša nozīme DNS integritātes atjaunošanā [54]. *BRCA1* un *BRCA2* ir audzēja supresoru proteīni, kas ir galvenie genoma stabilitātes uzturētāji, veicot dubultās DNS virknes pārrāvuma (DSB) homologiskās rekombinācijas labošanu (HRR) [3;64]. Neskatoties uz to, ka *BRCA1* un *BRCA2* sadarbojas, tiem ir atšķirīgas lomas DNS bojājumu reakcijas un labošanas procesos [64]. *BRCA1* ir daudzpusīgs un piedalās gan kontrolpunkta aktivizēšanā, gan DNS labošanā, bet *BRCA2* darbojas kā homologiskās rekombinācijas starpnieks [71;87]. *BRCA1* un *BRCA2* gēni ekspresijās krūts un olnīcu epiteliālās šūnās [54].

BRCA1 atrodas 17q21.31 hromosomā un sastāv no 22 eksoniem. *BRCA1* kodē daudzfunkcionālu proteīnu, kas sastāv no 1863 aminoskābēm un satur N-termināla RING domēnu, divus kodola lokalizācijas signālus (NLS), savīto spirāļu (*coiled coil*; CC) domēnu, serīna klastera domēnu (SCD) un divus C-termināla *BRCA1* (BRCT) domēnus (sk. 1.att. A daļu) [2]. N-termināla RING domēns saistās ar *BRCA1* asociēto RING domēna proteīnu 1 (*BARD1*), kas ir strukturāli līdzīgs *BRCA1* un veido RING dimēru ubikvitīna ligāzi (E3), kura nodrošina ubikvitīna pārnesei uz mērķa olbaltumvielām [54]. Ubikvitinācija regulē olbaltumvielu noārdīšanu, DNS labošanu un replikācijas stabilitāti [24]. Divi kodola lokalizācijas signāli (NLS) veicina *BRCA1* lokalizāciju kodolā, lai veiktu savas funkcijas DNS labošanā kā homologiskajās rekombinācijas (HR) un transkripcijas regulēšanā [54]. Turklāt *BRCA1* satur ļoti konservētu CC motīvu, kas tieši saista *PALB2*, kurš savieno *BRCA1* un *BRCA2* homologiskas rekombinācijas ceļā [14]. Serīna klastera domēns (SCD) ir *BRCA1* proteīna kritisks reģions, kam ir galvenā loma DNS bojājuma reakcijā (DDR) un šūnu cikla regulēšanā [64]. BRCT domēni atpazīst fosforilētus motīvus (pSer-X-X-Phe) un saistās ar vismaz trim proteīniem, piemēram, *BRIP1*, *CtIP* un *Abraxas*, veidot svarīgus kompleksus, kuri precīzi koordinē DNS labošanu, replikāciju un šūnu cikla kontrolpunktus [24;36;57]. Izmaiņas domēnos var ietekmēt uz *BRCA1* stabilitāti vai/un uz mijiedarbību ar citiem mērķproteīniem [64].

BRCA2 atrodas 13q13.1 un satur 27 eksonus, kas kodē 3418 aminoskābju garu proteīnu (sk. 1.att. B daļu) [33;45]. *BRCA2* N-termināla reģionā atrodas *PALB2* saistošais domēns un centrālā daļā atrodas *RAD51* saistošais domēns ar astoņiem konservētiem motīviem, kas saukti

par BRC atkārtojumiem, kuri sastāv aptuveni no 1000 aminoskābēm un veido 1/3 proteīna daļu [45;64]. DNS saistīšanas domēns (DBD), kas ir iesaistīts DSS1 piesaistīšanā, atrodas BRCA2 C-termināla reģionā un sastāv no spirālveida domēna (*helical domain*), torņa domēna (*Tower domain*) un trīs oligonukleotīdu saistīšanas (OB) ielocēm, kas ir atbilstīgi par BRCA2 augsto afinitāti pret ssDNS un dsDNS bojājumiem [3;12;87]. Ka arī C-termināla reģionā ir trīs kodola lokalizācijas signāli (NLS), kuriem ir izšķiroša nozīme, lai nodrošinātu BRCA2 pareizu lokalizāciju kodolā, kas ir nepieciešama, lai tas varētu piedalīties DNS labošanas procesos, un viens C-termināla RAD51 saistīšanas motīvs [12;43;45;77]. Atšķirībā no BRCA1 daudzfunkcionālās darbības, BRCA2 galvenā funkcija ir homologā rekombinācija [64].



1.att. *BRCA1* un *BRCA2* struktūra. Adaptēts no [63].

ClinVar datubāzē *BRCA1* gēnā reģistrēti ap 4300 un *BRCA2* gēnā ap 5400 patogēnu vai ticami patogēnu variantu, kur abos gēnos visbiežāk sastopami varianti ir rāmju nobīde un STOP kodonu veidojoši varianti, kuru rezultātā rodas saīsināti, nefunkcionējoši proteīni [33]. Apmēram 70% patogēnu variantu *BRCA1* gēnā un 67% *BRCA2* gēnā ir rāmja nobīdes varianti, kas kā STOP kodonu veidojoši varianti ir ziņoti visa gēna garumā [33]. Bieži tiek ziņoti arī splaisingu ietekmējoši varianti, jo īpaši tie, kas maina kanoniskās eksona un introna robežas, kā rezultātā rodas nepareiza mRNS izveidošana un olbaltumvielu saīsināšanās [14;24]. Aminoskābes maiņas varianti, kas izraisa vienas aminoskābes izmaiņas olbaltumvielas struktūrā, *BRCA1* un *BRCA2* gēnos var būt izaicinoši interpretācijā, jo aptuveni 45% no

ziņotiem variantiem joprojām tiek klasificēti kā varianti ar neskaidru nozīmi (VUS) [80]. Tomēr, ir redzama sakarība, ka 4% aminoskābes maiņas variantu ir patogēni un lielāka daļa ir ziņoti kritiski svarīgos funkcionālajos domēnos, piemēram, RING domēnā vai BRCT domēnā *BRCA1* gadījumā un DBD domēnā vai ar PALB2 mijiedarbības reģionā *BRCA2* gadījumā [36;57]. Jāatzīmē, ka līdz 7% variantu ir saistīti ar kopiju skaita variācijām (CNV), kas konstatētas, veicot delēciju vai duplikāciju analīzi [22;32].

1.2. Nākamās paaudzes sekvenčšanas tehnoloģija

Pirmās paaudzes sekvenčšana jeb Sangera sekvenčšana tika attīstīta 1977. gadā un joprojām tiek uzskatīta par DNS sekvenčšanas “zelta standartu” [11;42]. Tomēr ar to nav efektīvi sekvenčēt lielu gēnu un paraugu skaitu tās caurlaides spējas ierobežojumu un salīdzinoši augsto izmaksu dēļ [28;42]. Otrās paaudzes sekvenčšana jeb nākamās paaudzes sekvenčšana (NGS) kļuva par risinājumu, kas revolucionāri mainīja sekvenčšanas iespējas [28].

NGS tehnoloģija ir padarījusi iespējamu miljonu DNS fragmentu sekvenčšanu vienlaicīgi, izmantojot ļoti nelielu nukleīnskābju daudzumu, ievērojami samazinot laiku un izmaksas [30]. NGS tehnoloģija ir kļuvusi par spēcīgo instrumentu dažādās nozarēs, sākot ar fundamentālo bioloģiju un beidzot ar klīnisko diagnostiku, kas paplašina mūsu zināšanas par genomu, gēnu struktūrām un slimības molekulāriem mehānismiem [17;20;31;68].

Nākamās paaudzes sekvenčšana ir ievērojami uzlabojusi vēža pētījumu un klīnisko pētījumu iespējas un rezultātus, palīdzot identificēt slimības izraisošus variantus, atklāt jaunus zāļu mērķus un izskaidrot sarežģītas bioloģiskas parādības, tostarp audzēju heterogenitāti un audzēja attīstības procesus [13;17;31;80;90]. NGS tehnoloģijai ir dažādas pieejas, ko var izmantot noteiktos pētījumos vai diagnostikā: visa genoma sekvenčšana (WGS), visa eksoma sekvenčšana (WES), mērķtiecīga sekvenčšana (TS), metagenoma sekvenčšana, transkriptoma sekvenčšana utt. [42;52].

1.2.1. Mērķtiecīga sekvenčšana

Mērķtiecīgas sekvenčšanas tehnoloģija ir jaudīga pieeja nākamās paaudzes sekvenčšanā (NGS), kas ļauj precīzi izolēt un sekvenčēt interesējošus genoma reģionus [35;52]. Šo tehniku plaši izmanto klīniskajā diagnostikā un biomedicīniskajos pētījumos, īpaši gadījumos, kad ar slimību saistītie gēni jau ir zināmi [8;27;72]. Šī pieeja ievērojami palielina sekvenčšanas dziļumu un jutīgumu, vienlaicīgi samazinot izmaksas un datu sarežģītību, jo

ierobežotā genoma reģiona sekvencēšana samazina nejaušu atradumu risku ar iespējamiem ētiskiem apgrūtinājumiem [16;56]. Mērķtiecīgu reģiona bagātināšanu parasti panāk, izmantojot divas galvenās pieejas: amplikonu un hibridizācijas metodoloģijas [72].

Amplikonu metode ietver mērķtiecīgu genoma reģiona amplifikāciju, izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR) [30]. Parasti tiek izstrādāti vairāki praimeru un standartizēti PĶR apstākļi, lai tie darbotos vienlaicīgi vienā multipleksētā PĶR reakcijā, amplificējot vairākus tūkstošus reižu mērķa genoma reģionus, tādējādi bagātinot tos sekvencēšanai [30;68]. Pie PĶR produktiem vai amplikoniem tiek pievienoti ap 60-80 bp gari adapteri - specifiskas sekvencēšanas platformai sintētiski izveidotas DNS sekvences, kas ļauj DNS fragmentiem saistīties ar plūsmas šūnu (*flow cell*) sekvencēšanas nodrošināšanai [52;68]. Pēdējā solī pie izveidotiem DNS fragmentiem pirms attīrīšanas un bibliotēkas eluēšanas pievieno unikālas indeksu sekvences, kas ļauj apvienot un vienlaicīgi sekvencēt vairākus paraugus [30;68].

Salīdzinot ar amplikonu metodi, hibridizācijas metodē mērķa genoma reģioni tiek bagātināti (pavairoti), izmantojot specifiskus, vienpavediena oligonukleotīdus, ko sauc par “zondēm” [30]. Šīs zondes tiek hibridizētas ar mērķa reģioniem un pēc tam izolētas, lai iegūtu mērķa genoma sekvences. No sākuma kā amplikonu pieejā DNS tiek fragmentēta, izmantojot sonikācijas metodi vai enzimatisko sašķelšanu [30]. Tad fragmentiem tiek veikta galu rediģēšana, lai izveidotu strupceļu galus, kam seko A-galu veidošana, lai pievienotu adenīna pārkari (*overhangs*) adaptera ligācijai [30]. Sekvencēšanas adapteri, kuri satur unikālus svītrkodus multipleksēšanai, tiek piesaistīti fragmentiem. Ar ierobežoto ciklu PĶR (4-8 cikli) tiek veikta DNS amplifikācija ar adapteri, lai nodrošinātu pietiekami daudz izejmateriālu hibridizācijai, vienlaicīgi samazinot artefaktu dubultošanos [8;52]. Iegūto divpavediena fragmenti denaturē un pakļauj hibridizācijai ar biotīna marķētām zondēm, kas saistās komplementāri pie amplificētiem mērķa reģioniem [52]. Tālāk izveidotas bibliotēkas gatavas attīrīšanai un eluēšanai.

Ja salīdzināt divas pieejas, tad amplikonu metodes priekšrocība ir ātrs bibliotēku sagatavošanas laiks (1-2 dienas), neliels pievienots DNS daudzums (10-100 ng) un lētāk [56]. Hibridizācijas metodē bibliotēku sagatavošana aizņem 3-5 dienas un nepieciešamais DNS daudzums sasniedz 50-250 ng [56]. Turklāt, hibridizācijas pieeja ir labāk piemērota liela gēnu daudzuma sekvencēšanā (>50 gēni) un degradētiem DNS paraugiem, piemēram, izdalītām DNS no formalinā fiksētiem un parafinā iegultiem (FFPE) audiem [11].

Pateicoties pilna genoma sekvencēšanai (WGS) un pilna eksoma sekvencēšanai (WES) pētījumu rezultātiem visā pasaulē, gan pētniecībā, gan klīniskajā praksē ir pieejami komerciāli paneli mērķētu kandidātģēnu sekvencēšanai, kuri ir labi izpētīti un cieši saistīti ar noteiktām

slimībām [11;88]. Mērķtiecīgas sekvencēšanas paneļi ir paredzēti gan iedzimto, gan somatisko variantu testēšanai tādām saslimšanām kā iedzimti kardiovaskulāri defekti, aritmijas un kardiomiopātijas, neauglības stāvokļi, mieloīdie vēži, iedzimtas vielmaiņas traucējumi, un pārmantots vēzis [13;15;17;88].

1.3. Ģenētisko variāciju klasifikācija un interpretācija

Ģenētisko variantu interpretācija ir būtiska sastāvdaļa, jo īpaši tāpēc, ka nākamās paaudzes sekvencēšanas (NGS) tehnoloģija rada milzīgus datu apjomus klīniskajai diagnostikai [30;44;68;80]. Tomēr, ģenētisko datu sarežģītība rada izaicinājumus rezultātu interpretācijā, lai nošķirtu klīniski nozīmīgus patogēnus variantus no labdabīgiem polimorfismiem, kā rezultātā dažādās laboratorijās var rasties pretrunas variantu klasifikācijā [55;80;82]. Lai risinātu šo problēmu, Amerikas Medicīniskās ģenētikas un genomikas koledža (*American College of Medical Genetics and Genomics*, ACMG) sadarbībā ar Molekulārās patoloģijas asociāciju (*Association for Molecular Pathology*, AMP) 2015. gadā izstrādāja vadlīnijas, kas nodrošina standartizētu variantu interpretācijas sistēmu [61]. ACMG/AMP 2015 klasifikācijas pamatā ir 28 uz pierādījumiem balstīti kritēriji, kas ir atspoguļoti 1.pielikumā un 2.pielikumā. Patogenitātes kritēriji ir iedalīti četros līmeņos: ļoti spēcīgs (PVS1), spēcīgs (PS1-PS4), vidēji spēcīgs (PM1-PM6) un atbalstošs (PP1-PP5) [61]. Labdabīgie kritēriji tiek iedalīti kā neatkarīgi (BA1), spēcīgi (BS1-BS4) un atbalstoši (BP1-BP7). Šajās vadlīnijās varianti iedalīti piecos līmeņos: patogēni, ticami patogēni, ar neskaidru nozīmīgumu (VUS), ticami labdabīgi un labdabīgi. Varianta galīgo klasifikāciju noteica, izmantojot kritēriju kombināciju pēc īpašiem noteikumiem (sk. 3.pielikumā) [61].

ACMG/AMP 2015 vadlīnijas tika pilnveidotas 2024. gadā, integrējot kvantitatīvās Beijesa pieejas un gēniem specifiskus pielāgojumus, lai uzlabotu precizitāti, reproducējamību un klīnisko pielietojamību [23]. ACMG/AMP 2015 kritēriji ir pārveidoti kvantitatīvā Beijesa sistēmā, kur kritērijiem ir piešķirti patogenitātes (ļoti spēcīgs = 8, spēcīgs = 4, vidējs = 2, atbalstošs = 1) vai labdabīguma (spēcīgs = -4, vidējs = -2, atbalstošs = -1) pierādījumu punktus [50]. Pēc atjaunotām vadlīnijām ir izveidotas robežvērtības, kur pēc piešķirtiem punktiem variantu interpretē kā ≥ 10 (patogēns), 6-9 (ticami patogēns), 0-5 (VUS), -1 līdz -5 (ticami labdabīgs), ≤ -6 (Labdabīgs) [23].

1.3.1. Patogenitātes kritēriju apraksts

PVS1 kritēriju pielieto, kad ir nulles variants (STOP kodona veidojošs, rāmju nobīde, splaisingu ietekmējoši (donors/akceptors +/-1,2), iniciācijas kodona zaudējums, viena vai vairāku eksonu delēcija) gēnā, kurā ir zināms slimības mehānisms [50;61]. Piemēro atbilstošu stiprumu saskaņā ar PVS1 klasifikācijas diagrammu, kurā ņemtas vērā zināšanas par klīniski svarīgiem funkcionālajiem domēniem. [23]

PS1 kritēriju ar spēcīgu pakāpi pielieto aminoskābes maiņas variantiem ar citu nukleotīdu nomaiņu, ja iepriekš ir ziņots, ka šī aminoskābju izmaiņa ir patogēna un nav pretrunīgu pierādījumu [61]. Tas attiecas arī uz gadījumiem, kad funkcionālie testi vai klīniskie dati pārliecinoši apstiprina patogenitāti. Vidēju pakāpi PS1 kritēriju pielieto, ja iepriekš ir ziņots, ka šī aminoskābju izmaiņa ir ticami patogēna [23]. Atbalstošo pakāpi var piemērot kanoniskiem un nekanoniskiem locīšanas vietu variantiem [23]. Ja variants tajā pašā locīšanas vietā jau iepriekš ir klasificēts kā patogēns un, izmantojot tādas rīkus kā *SpliceAI*, tiek prognozēts, ka jaunajam variantam būs līdzīga vai lielāka kaitīgā ietekme.

Priekš *de novo* variantam pacientam ar slimību un bez ģimenes anamnēzes pielieto PS2 kritēriju, ja ir apstiprināta gan maternitāte, gan paternitāte, bet PM6 kritēriju pielieto, ja ir pieņemts *de novo* variants, bet paternitātes un maternitātes nav pārbaudīta [61]. Sekvences variantu interpretācijas (SVI) darba grupa ierosina uz punktiem balstītu sistēmu, lai noteiktu *de novo* pierādījumu stiprumu, pamatojoties uz trim parametriem: apstiprināta vecāku radniecība salīdzinājumā ar pieņemto vecāku radniecības statusu, fenotipiskā konsekvence un *de novo* novērojumu skaits [23]. Saskaitot punktus var piešķirt pierādījumu stiprumu PS2 un PM6 kritērijiem, kur 0,5 punkti dot atbalstošu līmeni, viens punkts piešķir vidējo līmeni, divi punkti piešķir spēcīgu līmeni un četri punkti ļoti spēcīgu līmeni [23].

PS3 kritērijs ar atbalstošu līmeni pielieto variantam, kad ir labi pierādīti *in vitro* vai *in vivo* funkcionālie pētījumi, kas apstiprina kaitīgu ietekmi uz gēnu vai gēnu produktu [23]. Par visuzskatāmākajiem uzskata funkcionālos pētījumus, kas ir apstiprināti un pierādījuši, ka tie ir reproducējami un stabili klīniskās diagnostikas laboratorijas apstākļos [23].

PS4 kritēriju ar atbalstošu līmeni izmanto, kad varianta izplatība skartajos indivīdos ir ievērojami lielāka salīdzinājumā ar izplatību kontrolgrupās. Gadījuma-kontroles pētījumos iegūtais varbūtības koeficients (OR) ir $> 5,0$, un ticamības intervāls neietver 1.0. Ļoti retu variantu gadījumos, kad variants ir novērots vairākiem nesaistītiem pacientiem ar tādu pašu fenotipu un tā trūkumu kontroles grupās var izmantot vidējā pierādījumu līmenī [23].

PM1 kritērijs ar vidējo pierādījumu pakāpi pielietots variantam, kas atrodas *hot spot* un/vai kritiskā un labi zināmā funkcionālā domēnā bez labdabīgiem blakus variantiem [50;61].

PM1 kritērijs var piemērot arī atbalsta līmenī labi zināmiem funkcionāliem nekodējošiem lokusiem ar pārliecinošiem pierādījumiem par iespējamu ietekmi uz gēnu ekspresiju transkripcijas vai translācijas līmenī [23]. PM1 var paaugstināt līdz spēcīgam līmenim attiecībā uz ļoti specifiskām sastāvdaļām, kas ir kritiski svarīgas olbaltumvielas struktūrai vai funkcijai [23].

PM2 kritēriju atbalsta līmeni ir rekomendēts pielietot, kad genoma agregācijas datu bāzē nav kontroles grupās vai to biežums ir ļoti zems, ja tas ir recesīvs [23;61].

PM3 kritēriju piemēro recesīvām saslimšanām, ja ir apstiprināts, ka divi varianti skartajai personai ir atrodami pretējās alēlēs (in trans) [61]. Pierādījumu stiprums ir atkarīgs no tādiem faktoriem kā fāzes apstiprinājums, otrā variantā klasifikācija (patogēns, iespējams patogēns vai nenoteiktas nozīmes) un alēļu biežuma robežvērtības [23]. Atbalsta līmenis ir piešķirts, kad ir savākts tikai 0,5 punkta, vidējais līmenis ir piešķirts vienam punktam, spēcīgu līmeni ir diviem punktiem un četriem punktiem pielieto ļoti spēcīgu līmeni [23].

PM4 kritēriju pielieto proteīna garuma izmaiņā, kas radušās iekšēja rāmja delēcijas/insercijas neatkārtojamā reģionā vai *stoploss* varianta gadījumā [50;61]. Šo kritēriju izmanto iekšējiem rāmja delēcijām vai insercijām eksonā [61]. Piesardzība ir ieteicama attiecībā uz vienas aminoskābes iekšēja rāmja delēcijām vai insercijām, kur šo kritēriju var izmantot atbalsta līmenī, ja vien nav gēnu specifisku pierādījumu, kas pamato mērena līmeņa kritērija izmantošanu [23].

PM5 kritērijs ir pielietots atbalsta līmenī jauniem aminoskābes maiņas variantiem, kur jau iepriekš ir novērota cita aminoskābes maiņas izmaiņa, kas noteikta kā patogēna [23].

PP1 kritēriju pielieto varianta segregācija ģimenes locekļiem ar slimības simptomiem, kurus izraisa šis gēns [50;61]. Segregācijas datus var izmantot autosomāli dominējošiem, autosomāli recesīviem, ar X saistītiem un imprintinga traucējumiem [61]. Jo vairāk segregācijas datu, jo lielāks pierādījumu līmenis, bet kritēriju pielieto ņemot vērā nevis indivīdu skaits, bet mejožu skaits [23].

PP2 kritērijs pielieto atbalsta pierādījumu līmenī, kad aminoskābes maiņas variants ir gēnā, kurā ir zems labdabīgu aminoskābes maiņas variāciju īpatsvars un kurā aminoskābes maiņas varianti ir izplatīti slimības mehānisms [23;61]. Bet arī vērtīgi pārbaudīt vai tolerē aminoskābes maiņas variantus tajā gēna rajonā.

PP3 kritēriju pielieto, kad skaitliski pierādījumi (*in silico*) apstiprina kaitīgu ietekmi uz gēnu vai gēna produktu, bet pēc pēdējām atjaunotām rekomendācijām jāpielieto atbalsta pierādījumu līmenī [23].

PP4 kritērijs apraksta situāciju, kad pacienta fenotips vai ģimenes anamnēze ir ļoti specifiska slimībai ar vienu ģenētisku etioloģiju [61]. PP4 stipruma līmeņi ir precizēti,

pamatojoties uz fenotipisko pierādījumu specifiskumu un kvalitāti [61]. Parasti ir rekomendēts izmantot atbalsta pierādījumu līmeni, ja ir novērotas vispārējas bioķīmiskas novirzes, bet trūkst precīzas kvantitatīvas noteikšanas, savukārt merēnu pierādījumu līmeni piemēro, ja ir sasniegtas konkrētas robežvērtības [23]. Dažos gadījumos var piemērot spēcīgu pierādījumu līmeni, kad ir atbildes reakcija uz ārstēšanu ar zālēm, enzīmu aktivitātes analīzi, specifiskiem asins rādītājiem, metilācijas parakstu vai muskuļu biopsijas analīzi, kas ir patognomoniska īpašam ģenētiskam traucējumu cēloņam un bez ģenētiska apstiprinājuma būtu uzskatāma par diagnostisku atradumu [23].

1.3.2. Labdabīguma kritēriju apraksts

BA1 kritēriju piemēro, ja variantu mazo alēļu biežums (MAF) pārsniedz 5 % (0,05) vispārējā kontinentālās populācijas datu kopā (piemēram, gnomAD, ExAC) ar ≥ 2000 reģistrētajām alēlēm [61]. Ja ir izpildīts BA1 nosacījums, variantu var klasificēt kā labdabīgu, neprasot papildu pierādījumus [23;61].

BS1 kritēriju ar spēcīgu pierādījumu līmeni piemēro, ja variantu alēļu biežums ir lielāks, nekā sagaidāms saistītajam traucējumam, ņemot vērā tā izplatību, iedzimtību un iedzimtības modeli [61]. Attiecībā uz autosomāli dominantām slimībām ar augstu penetranci ir pieņemami izmantot arī BS1 kritēriju spēcīgā līmenī kā atsevišķu pierādījumu, lai variantu klasificētu kā ticami labdabīgu [23].

BS2 kritēriju pielieto ar spēcīgu līmeni, kad variants ir novērots veselam pieaugušam indivīdam recesīvu (homozigotisku), dominējošu (heterozigotisku) vai ar X saistītu (hemizigotisku) slimības gadījumu ar paredzamu pilnīgu penetranci agrīnā vecumā [23;61].

BS3 kritērijs ar spēcīgu pierādījumu līmeni sniedz pārliecinošus pierādījumus par labdabīgumu, pamatojoties uz funkcionāliem pētījumiem, kas pierāda, ka variants netraucē normālu gēna vai proteīna funkciju [23;61].

BS4 kritērijs sniedz pārliecinošus pierādījumus par labdabīgumu, pamatojoties uz kopsegregācijas datiem [23;61]. To piemēro, ja ģenētiskais variants nesegregējas ar slimības skartajiem ģimenes locekļiem, t. i., variants ir novērots neskartiem indivīdiem vai nav novērots skartiem indivīdiem ciltsrakstā [61]. Šis kritērijs palīdz izslēgt variantus, kas, visticamāk, nav saistīti ar slimību.

BP1 kritērijs sniedz apstiprinošus pierādījumus par labdabīgumu, ja aminoskābes maiņas variants rodas gēnā, kur saīsināšanas varianti ir dominējošais slimības cēlonis, un aminoskābes maiņas variantu patogenitāte ir mazāk iespējama [23;61]. BP1 ir īpaši svarīgs

gēniem ar labi raksturotiem slimības mehānismiem, piemēram, tiem gēniem, kurus galvenokārt ietekmē funkcijas zuduma (LoF) varianti [23].

BP2 kritērijs pielieto ar atbalsta pierādījumu līmeni, ja variants ir novērots *in trans* (uz dažādām alēlēm) ar patogēnu variantu dominantam gēnam/slimībai ar pilnu penetranci vai novērots *in cis* (uz tās pašas alēles) ar patogēnu variantu jebkurā pārmantošanas veidā [61].

BP3 kritērijs sniedz apstiprinošus pierādījumus par labdabīgumu, ja variants atrodas atkārtotā vai homologā genoma reģionā un tā izmaiņas neietekmē gēna funkciju [23;61].

BP4 kritērijs sniedz apstiprinošus pierādījumus par labdabīgumu, ja skaitļošanas rīki (*in silico*) paredz, ka variants neietekmēs olbaltumvielu funkciju vai gēnu locīšanu.

BP5 kritērijs sniedz apstiprinošus pierādījumus par labdabīgumu, ja variants ir konstatēts gadījumā, kad pastāv alternatīvs slimības molekulārais pamats [23;61]. Kritēriju piemēro tad, ja tiek konstatēts cits ģenētiskais variants vai molekulārais mehānisms, kas ir galvenais slimības cēlonis indivīdam, tādējādi samazinot varbūtību, ka vērtējamais variants veicina slimības rašanos [61].

BP7 kritērijs sniedz apstiprinošus pierādījumus par labdabīgumu, ja variants ir sinonīma (klusā) izmaiņa vai nekodējošs variants, par kuru tiek prognozēts, ka tam nebūs ietekmes uz sazaršanu, un ja tas atrodas nukleotīdu vietā, kas nav ļoti konservatīva [23;55;61]. *ClinGen Splicing SVI* grupa iesaka izmantot BP7 kritēriju attiecībā uz introniskiem variantiem un sinonīmiem variantiem, par kuriem RNS pētījumi liecina, ka tiem nav ietekmes uz sazaršanu [81]. Ja ar atbilstošu *in vitro* testu ir apstiprināts, ka aizvietojumam nav ietekmes uz sazaršanu, BP7 var palielināt svaru līdz spēcīgam pierādījumu līmenim [23].

1.3.3. *BRCA1* un *BRCA2* vadlīnijas

Precīza *BRCA1* un *BRCA2* variantu interpretācija ir ļoti svarīga klīnisko lēmumu pieņemšanā, novērtējot iedzimta krūts un olnīcu vēža risku [23;55]. ACMG/AMP sistēma, kas papildināta ar ENIGMA konsorcijs un *ClinGen Variant Curation Expert Panels* (VCEPs) specifiskiem gēnu kritērijiem, nodrošina strukturētu pieeju variantu klasificēšanai kā patogēnus, labdabīgus vai ar neskaidru nozīmīgumu (VUS) [55]. Attiecībā uz *BRCA1* un *BRCA2* šie kritēriji tiek piemēroti, ņemot vērā konkrētus gēnus, jo ir pierādīts, ka galvenie slimības mehānismi ir funkcijas zuduma varianti [55].

BRCA1 un *BRCA2* variantu interpretācijas vadlīnijas nav piemērojami PS2 un PM6 kritēriji, jo ar *BRCA1* un *BRCA2* saistītie vēži sastopami salīdzinoši bieži un nav informācijas, lai kalibrētu *de novo* sastopamo gadījumu prognozēšanas spēju [55].

PS4 kritērijs tiek pielietots tikai spēcīgā pierādījumu līmenī, kad variantu izplatība skartajos indivīdos ir ievērojami lielāka salīdzinājumā ar izplatību kontrolē, kas ir ieteicamākā pieeja, bet pretējā gadījumā var izmantot kontroles pētījumu p vērtību $\leq 0,05$ un $OR \geq 4$. Vidēju pierādījumu līmeni nav ieteicams izmantot [55].

ENIGMA VCEP ir pielāgojusi ACMG/AMP kritērijus attiecībā uz *BRCA1* un *BRCA2*, uzsverot tādus tiešus pierādījumus kā funkcionālie testi (PS3) un funkciju zaudēšanas varianti (PVS1) [55]. Lai gan PM1 un PM4 nav primārais kritērijs, tā jēdzieni ir netieši integrēti, izmantojot bioinformātisko analīzi, kas izmantota PP3/BP4 [55]. PP2 nesniedz nozīmīgus pierādījumus variantu klasifikācijai, jo dominē funkcijas zuduma mehānismi [55].

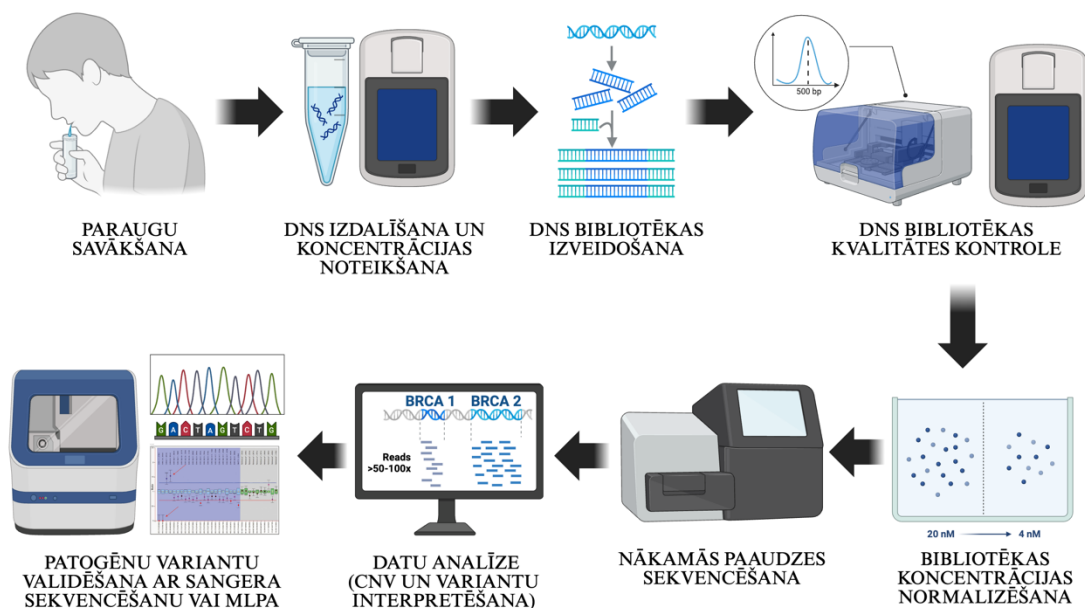
PP2 kritērijs netiek izmantots *BRCA1* un *BRCA2* variantu interpretēšanā, jo labdabīgi aminoskābes maiņas varianti ir salīdzinoši bieži sastopami [55].

BP2 piemēro tikai BS2 kontekstā, kas ietver variantu novērošanu veseliem indivīdiem. Tas ir tāpēc, ka ar variantu līdzāspastāvēšanu *cis* vai *trans* vien nepietiek, lai variantu klasificētu kā labdabīgu bez papildu pierādījumiem [55]. BP3 kritērijs nepielieto, jo netieši tiek risināts, izmantojot bioinformātikas rīkus (PP3/BP4) un domēnu analīzes, tāpēc tā patstāvīga piemērošana ir mazāk nozīmīga [55].

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Eksperimenta dizains

Pētījuma dizains izstrādāts un īstenots pilotprojekta “Pārmantota krūts un olnīcu vēža riska ģenētiskais skrīnings” ietvaros (sk. 2.att.), pateicoties *Lindex Latvia* ziedojuma atbalstam un *Longenesis, E. Gulbja* laboratorijas sabiedrības partneriem. Ģenētiskā testēšana veikta RSU Onkoloģijas un molekulārās ģenētikas institūtā.



2.attēls. Pētījuma shematiskais attēlojums.

2.2. Pētījuma dalībnieki un paraugi

Pirms dalībnieku iekļaušanas pētījumā, tika saņemti Centrālās medicīnas ētikas komitejas 17.03.2023 Nr. 01-29.1.2/1351 un Genoma izpētes padomes atzinumu 31.03.2023. Nr.A-1/23-03-20.

Pētījumā piekrita piedalīties 538 dalībnieki, kur 537 ir sievietes un viens vīrietis. Pētījumā iekļaušanas kritēriji bija vecums no 25 līdz 59 gadiem un nosacījums, ka nav diagnosticēts krūts vai olnīcu vēzis.

Pētījums dalībnieki nodeva siekalu paraugus E. Gulbja laboratorijā, izmantojot siekalu vākšanas un saglabāšanas komplektu (Norgen Biotek Corp., Kanāda). Savāktie siekalu paraugi tika nodoti RSU Onkoloģijas un molekulārās ģenētikas institūta Molekulārās ģenētikas zinātniskā laboratorijas darbiniekiem, kur DNS tika izdalīta ar fenola-hloroforma metodi. Informācija par darbā izmantotajām laboratorijas iekārtām atrodama 1.tabulā.

Laboratorijas iekārtas.

Iekārta	Ražotājs, valsts
Centrifūga lielā, Eppendorf® Centrifuge 5810/5810R	Eppendorf, Vācija
Maisītājs, Vortex V-1 plus	Biosan, Latvija
Spektrofotometrs, Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific™, ASV
Fluorometrs, Fluorometer Invitrogen Qubit 9V	Thermo Scientific™, ASV
Elektroforēzes sistēma, PowerPRO 300 Power Supply, 300V, 700mA, 150W	Cleaver Scientific Ltd CS-300V, Lielbritānija
Mikroviļņu krāsns, Daewoo Microwave,	Daewoo Electronics, Dienvidkoreja
Mikropipetes, 1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL	Eppendorf, Vācija
Magnētiskais statīvs, DynaMag™-2 Magnet	Thermo Scientific™, ASV
Termocikleris, Peqlab peqSTAR	Avantor, ASV
Sekvencēšanas iekārta, MiSeq	Illumina, ASV
Kapilāru elektroforēzes sistēma, QIAxcel Advanced	QIAGEN, Vācija
Ģenētiskais analizators, Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer	Thermo Scientific™, ASV
Termostats, CH-100	Biosan, Latvija

Informācija par darbā izmantotajiem reaģentiem atspoguļota 2.tabulā.

Izmantotie reaģenti

Reaģents	Ražotājs, valsts
Agarozē, Thermo Scientific™ TopVision Agarose	Thermo Scientific™, ASV
Etanols 96%	
Etīdija bromīda ūdens šķīdums, 10 mg/mL	Sigma-Aldrich, ASV
Garuma marķieris, MassRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific™, ASV
UltraPure™ DNA Typing Grade 50x TAE Buffer	Invitrogen, ASV
Uznesšanas krāsa, 6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific™, ASV
Qubit™ ds DNA HS Assay kit	Invitrogen
Bilbiotēku sagatavošanas reaģentu komplekts, QIAseq Targeted DNA Pro Custom Panel	QIAGEN, Vācija

Bibliotēku normalizēšanas reaģentu komplekts, QIAseq

QIAGEN, Vācija

Normalizer Kit

Siekalu paraugu DNS paņemšanas un uzglabāšanas komplekts	Norgen Biotek Corp, Kanāda
10 nM dNTP mix	Thermo Scientific, ASV
FastAP	Thermo Scientific, ASV
ExoI	Thermo Scientific, ASV
Big Dye	Thermo Scientific, ASV
5x Seq bufferis	Thermo Scientific, ASV
5 U Taq polimerāze	Thermo Scientific, ASV
25 mM MgCl ₂	Thermo Scientific, ASV

2.3. Paraugu sagatavošana bibliotēkas izveidei

Izdalītā DNS izmantota bibliotēku izveidei, kuras sekvencētas ar nākamās paaudzes sekvencēšanas metodi. Bibliotēku sagatavošanā izmantoja *QIAseq Targeted DNA Pro Custom Panel* (QIAGEN N.V., Vācija) bibliotēku izveidošanas reakcijas komplektu pēc ražotāja norādījumiem.

2.3.1. DNS fragmentēšana un fragmentu galu sagatavošana

Pirmajā posmā sagatavota DNS enzimatiskā fragmentēšanas reakcija. Jaunos 0,2 mL stobriņos pārnesa 42,0 ng DNS un pievienoja no nukleīnskābēm brīvu ūdeni, lai kopējais tilpums būtu 9,8 mL. Fragmentēšanas reakcijas maisījumu sagatavoja uz ledu pievienojot 1,4 mL 10x FX Buffer un 2,8 mL 5x WGS FX Mix. Gatavo fragmentēšanas maisījumu ievietoja pie 4 °C. Inkubācijas apstākļi ir norādīti 3.1. tabulā. Pēc inkubācijas fragmentēšanas maisījumu atdzesēja līdz 4 °C, pārnesa fragmentēšanas reakciju uz ledu un uzreiz pārgāja pie nākamā soļa.

3.1. tabula

Fragmentēšanas reakcijas apstākļi		
Posms	Temperatūra, °C	Inkubācijas laiks
Priekšdzesēšana	4	-
Dzesēšana	4	1 min
Denaturācija	32	10 min
Fragmentēšana	65	15 min
Dzesēšana	4	-

2.3.2. Adapteru ligēšana

Adapteru saistīšana ir svarīgs nākamās paaudzes sekvenēšanas (NGS) bibliotēkas sagatavošanas posms, kurā specifiski adapteri tiek pievienoti DNS fragmentiem, lai nodrošinātu sekvenēšanu tādās platformās kā Illumina. Šis process nodrošina savietojamību ar sekvenēšanas ķīmiju, atvieglo multipleksēšanu un nodrošina praimeru saistīšanās vietas amplifikācijai un sekvenēšanai. Pie iegūtas fragmentēšanas reakcijas pievienoja 10,0 µL 2,5x *UPH Ligation Buffer*, 1,5 µL *AdP-IL5-Phased Adapter* un 2,5 µL DNS ligāzi un samaisa pipetējot. Sagatavoto adapteru ligēšanas reakciju ievietoja iepriekš atdzesētā līdz 4 °C termociklerī ar aprakstītiem inkubācijas apstākļiem 3.2. tabulā.

3.2. tabula

Adepteru ligēšanas reakcijas apstākļi		
Posms	Temperatūra, °C	Inkubācijas laiks
Dzesēšana	4	1 min
Denaturācija	20	15 min
Fragmentēšana	65	20 min
Dzesēšana	4	-

Pēc ligēšanas paraugus pārnesa uz ledus un pievienoja 2,0 µL *Ligation Cleanup Reagent* katram paraugam. Samaisīt, pipetējot uz augšu un uz leju vismaz 12 reizes, un īsi nocentrifugēja. Sagatavoto attīrīšanas reakciju ievietoja iepriekš atdzesētā līdz 4 °C termociklerī ar aprakstītiem inkubācijas apstākļiem 3.3. tabulā. Pēc inkubācijas tika sagaidīts kamēr temperatūra sasnies 4 °C un tad pārvietoja reakcijas uz ledus.

3.3. tabula

Ligēšanas reakcijas attīrīšanas apstākļi		
Posms	Temperatūra, °C	Inkubācijas laiks
Dzesēšana	4	1 min
Denaturācija	37	15 min
Fragmentēšana	95	10 min
Dzesēšana	4	-

2.3.3.Targeted Enrichment (pavairošanas) reakcija

Pagatavoja *Targeted Enrichment* reakciju uz ledus, pievienojot 10,0 µL 5x *TEPCR Buffer*, 6,3 µL *QIAseq Targeted DNA Pro Panel*, 2,0 µL *SmP-IL5 TEPCR-F Primer*, 1,95 µL *TEPCR modifier* un 2,4 µL *QN Taq Polymerase*. Samaisīja reakciju pipetējot un īsi nocentrifugēja. Ievietoja termociklerī un inkubēja pie apstākļiem aprakstītiem 3.4.tabulā. Pēc inkubācijas tika sagaidīts kamēr temperatūra sasniegs 4 °C un tad pārvietoja reakcijas uz ledus.

3.4. tabula

Mērķa bagātināšanas reakcijas apstākļi		
Ciklu skaits	Temperatūra, °C	Inkubācijas laiks
1	98	2 min
8	98	15 s
	67	2 min
1	72	3 min
1	4	-

Pārnesa 20,0 µL *Targeted Enrichment* reakcijas jaunajos 0,2 mL stobriņos un pievienoja 5,0 µL *TEPCR Cleanup Reagent*. Samaisīt, pipetējot uz augšu un uz leju vismaz 12 reizes, un īsi nocentrifugēja. Sagatavoto attīrīšanas reakciju ievietoja iepriekš atdzesētā līdz 4 °C termociklerī ar aprakstītiem inkubācijas apstākļiem 3.5. tabulā. Pēc inkubācijas tika sagaidīts kamēr temperatūra sasniegs 4 °C un tad pārvietoja reakcijas uz ledus.

3.5. tabula

Mērķa bagātināšanas reakcijas attīrīšana		
Posms	Temperatūra, °C	Inkubācijas laiks
Dzesēšana	4	1 min
Denaturācija	37	15 min
Fragmentēšana	95	10 min
Dzesēšana	4	-

2.3.4.Indeksu piesaiste

Paraugu multipleksēšana ir viens no svarīgākajiem NGS rīkiem, lai palielinātu caurlaidspēju un samazinātu izmaksas. Tā darbojas, apvienojot vairākus paraugus, kas jāapstrādā kopā vienā sekvencēšanas reizē; tā rezultātā sekvencēšanas nolasījumi ir

demultipleksificējami, katru atsevišķu nolasījumu atkal attiecinot uz tā sākotnējo avota bibliotēku. To atvieglo paraugu indeksu sekvenču integrēšana atsevišķās bibliotēkas molekulās. Targeted Enrichment reakcijā pievienoja 20,0 μ L 5x *UPCR Buffer*, 4,8 μ L *QN Taq Polymerase*, 45,2 μ L no nukleīnskābju brīvā ūdens un 5,0 μ L *Index primers* no *QIAseq Targeted DNA Pro UDI index* plates. Samaisīja reakciju pipetējot un īsi nocentrifugēja. Ievietoja termociklerī pie sekojošiem apstākļiem aprakstītiem 3.6.tabulā. Pēc inkubācijas tika sagaidīts kamēr temperatūra sasniegs 4 °C un tad pārvietoja reakcijas uz ledus.

3.6. tabula

Universālās PCR reakcijas apstākļi		
Ciklu skaits	Temperatūra, °C	Inkubācijas laiks
1	98	2 min
28	98	15 s
	62	30 s
1	72	3 min
1	4	-

Tālāk tika attīrītas sagatavotas bibliotēkas. Iepriekšējai reakcijai pievienoja 80,0 μ L *QIAseq Beads* un samaisīt, pipetējot uz augšu un uz leju vismaz 12 reizes. Izņēma reakcijas no ledus un inkubēja 5 minūtes istabas temperatūrā. Pēc inkubācijas ievietoja paraugus magnētiskā statīvā uz 5 minūtēm līdz šķīdums kļuva caurspīdīgs. Ar mikropipeti uzmanīgi noņēma supernatantu. Pievienoja 100,0 μ L no nukleīnskābju brīvā ūdens un 80,0 μ L *QIAseq Bead Binding Buffer*, izņēma no magnētiska statīva, novorteksēja un nocentrifugēja. Tad novietoja atpakaļ magnētiskā statīvā uz 5 minūtēm līdz šķīdums kļuva caurspīdīgs. Ar mikropipeti uzmanīgi noņēma supernatantu, pievienoja 200,0 μ L 80% etanola un ar mikropipeti uzmanīgi noņēma supernatantu. Atkārtoja mazgāšanu ar etanolu kā iepriekšējā solī. Stobriņus ar nogulsni atstāja žāvēties ar atvērtiem vāciņiem istabas temperatūrā uz 10 minūtēm. Kad etanols iztvaikojas, tad stobriņi tika izņemti no magnētiska statīva. Paraugiem pievienoja 30,0 μ L no nukleīnskābju brīvā ūdens un savorteksēja, pēc tam īsi nocentrifugēja un novietoja magnētiskā statīvā. Sagaidīja 5 minūtes līdz šķīdums kļuva caurspīdīgs un pārnesa 28,0 μ L supernatanta uz jauniem 0,2 mL stobriņiem.

2.3.5. Izveidotu bibliotēku kvalitātes kontrole

Attīrītām bibliotēkām tika pārbaudīta iegūta koncentrācija un fragmenta garums. Fragmentu koncentrācija tika noteikta fluorimetriski ar *Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity Assay kit* reaģentu komplektu. Pirms paraugu koncentrāciju mērīšanas tika kalibrēts *Qubit™ 4 Fluorometer* instruments ar reaģentu komplektā iekļautajiem diviem standartšķīdumiem, samaisot 10,0 µL standartšķīdumu ar 190,0 µL reaģentu maisījuma. Tālāk tika veikts paraugu mērījumi, samaisot 199,0 µL reaģentu maisījuma un 1,0 µL attīrīto DNS fragmentu, un fragmentu koncentrāciju izteica ng/µL. Fragmentu garums tika pārbaudīts izmantojot *TapeStation (QIAxcel)* kapilārās elektroforēzes iekārtu. Vispirms tika pagatavots marķieris priekš fragmentu garuma noteikšanai, samaisot 0,2 mL stobriņā 1,0 µL *QX DNS Marker* (50-800 bp) un 19,0 µL *DNA Dilution Buffer*, novorteksēja, nocentrifugēja un novietoja atbilstošā pozīcijā iekārtā. Ka arī 15,0 µL *QX Alignment Marker* (15 bp/1 kb) tika pievienoti 12 PĶR stobriņos un novietoti atbilstošā pozīcijā. Paraugu mērīšanai 0,2 mL stobriņos samaisīja 8,0 µL *DNA Dilution Buffer* un 7,0 µL attīrītā parauga, vorteksēja, nocentrifugēja un ievietoja ierīcē. Fragmentu sadalījuma pīķim jābūt ap 540 bp.

2.4. Bibliotēku normalizēšana

Bibliotēku normalizēšana ir svarīgs posms, lai panāktu vienmērīgu sekvencēšanas dziļumu visiem paraugiem. Ja neizdosies apvienot bibliotēkas vienādās proporcijās, tad nepietiekami reprezentētās bibliotēkas dos pārāk maz sekvencēšanas nolasījumu, savukārt pārākumā reprezentētās bibliotēkas zaudē sekvencēšanas jaudu. Lai nodrošinātu bibliotēku apvienošanu ar pietiekamu precizitāti, ir jākvantificē un jāšķaida līdz vienādai koncentrācijai visas bibliotēkas atsevišķi pirms apvienošanas, kas ir laikietilpīgi un ir augstā iespēja pieļaut kļūdu strādājot ar lielo paraugu skaitu. Tāpēc darbā tika izmantots *QIAseq Normalizer Kit* (QIAGEN N.V., Vācija) bibliotēku normalizēšanas reakcijas komplekts pēc ražotāja norādījumiem.

2.4.1. Bibliotēkas modifikācija

No sākuma tika pagatavots bibliotēkas modifikācijas reakcijas maisījums, samaisot uz ledus 25,0 µL *2X HiFi PCR Master Mix*, 1,5 µL *Normalizer Primer Mix*, 20,0 µL attīrītas izveidotas bibliotēkas un 3,5 µL no nukleīnskābju brīvā ūdens. Novorteksēja reakcijas maisījumu un īsi nocentrifugēja, tad ievietoja termociklerī pie sekojošiem apstākļiem

aprakstītiem 4. tabulā. Pēc inkubācijas tika sagaidīts kamēr temperatūra sasniegs 4 °C un tad pārvietoja reakcijas uz ledus.

4. tabula

Modifikācijas PQR amplifikācijas apstākļi		
Ciklu skaits	Temperatūra, °C	Inkubācijas laiks
1	98	2 min
2	98	20 s
	60	30 s
	72	30 s
1	72	2 min
1	4	-

Pie gatavas reakcijas pievienoja 50,0 µL homogenizēto *QIAseq Beads*, savorteksēja un īsi nocentrifugēja. Atstāja paraugus inkubēties uz 5 minūtēm istabas temperatūrā. Pēc inkubācijas ievietoja paraugus magnētiskā statīvā uz 5 minūtēm līdz šķīdums kļuva caurspīdīgs. Ar mikropipeti uzmanīgi noņēma supernatantu. Tad pievienoja 150,0 µL 80% etanola un ar mikropipeti uzmanīgi noņēma supernatantu, atkārtoja mazgāšanu un noņēma ar mazāko mikropipeti pēc iespējas visu etanolu. Stobriņus ar nogulsni atstāja žāvēties ar atvērtiem vāciņiem istabas temperatūrā uz 10 minūtēm. Kad etanols iztvaikojas, tad izņēma stobriņus no magnētiska statīva un pievienoja 20,0 µL no nukleīnskābju brīvā ūdens. Sahomogenizēja nogulsni ar pipeti un atstāja inkubēties uz 2 minūtēm istabas temperatūrā. Īsi nocentrifugēja un ievietoja magnētiskā statīvā uz 5 minūtēm līdz šķīdums kļuva caurspīdīgs. Pārnesa 18,0 µL supernatanta uz jauniem 0,2 mL stobriņiem.

2.4.2. Modificētas bibliotēkas normalizēšana

Pirms turpināt normalizēšanas protokolu, *Normalizer Wash Buffer* alikvotēja 1,5 mL stobriņos un ievietoja termoblokā pie 55 °C līdz reaģenta izmantošanai. Jaunos 0,2 mL stobriņos pārnesa 15,0 µL modificētas bibliotēkas un pievienoja 5,0 µL iepriekš homogenizētā *Normalizer Reagent*. Savorteksēja un īsi nocentrifugēja, atstāja inkubēties uz 10 minūtēm istabas temperatūrā. Stobriņos pievienoja 200,0 µL iepriekš sasildītā *Normalizer Wash Buffer* un samaisīja ar pipeti. Stobriņus ievietoja magnētiskā statīvā uz 2 minūtēm līdz šķīdums kļuva caurspīdīgs un tad ar mikropipeti uzmanīgi noņēma supernatantu, atkārtoja mazgāšanu un noņēma ar mazāko mikropipeti pēc iespējas visu supernatantu. Uzreiz pēc supernatanta noņemšanas pievienoja 26,0 µL *Normalizer Elution Buffer*, savorteksēja un īsi nocentrifugēja

paraugus. Stobriņus ievietoja termociklerī inkubēties uz 5 minūtēm pie 55 °C. Pēc inkubācijas ievietoja paraugus magnētiskā statīvā uz 2 minūtēm līdz šķīdums kļuva caurspīdīgs un tad pārnesa 25,0 µL supernatanta uz jauniem 0,2 mL stobriņiem. Iegūtām normalizētām bibliotēkām tika pārbaudīta koncentrācija, izmantojot *Qubit™ IX dsDNA High Sensitivity Assay kit* reaģentu komplektu, kā tas aprakstīts 2.4.5. apakšnodaļā. Pēc ražotāja piedāvātas tabulas sagaidīta normalizētas 540 bp garas bibliotēkas koncentrācija jābūt ap 1,43 ng/µL, kas jāatbilst 4 nM koncentrācijai.

2.5. Paraugu DNS sekvencēšana

Normalizētas līdz 4 nM bibliotēkas 538 paraugiem tika sadalītas un apvienotas aptuveni vienādās 4 grupās (134:134:135:135). Katrai grupai paraugus samaisīja jaunajos 1,5 mL stobriņos, pievienojot pa 5,0 µL no katra parauga. Tālāk paraugi tika nodoti E. Gulbja laboratorijā, kur DNS sekvencēja uz *MiSeq* sekvencēšanas sistēmas no *Illumina*, izmantojot *MiSeq Reagent Kit v3 600 cycle kit*.

2.6. Datu apstrāde un analīze

Jēldatu apstrādei un analīzei izmantoja *CLC Genomics Workbench* 23.0.5 programmatūru. Iegūti sekvencēšanas laikā *fastq* faili tiek importēti programmā analizēti ar ražotāja izstrādātu un piedāvāto darba plūsmu pārmanotu ģenētisko variantu detektēšanai izmantojot *Targeted DNA Pro* mērķēto paneli. Katram izanalizētam paraugam tiek pārbaudīts pārklājums, kvalitātes radītāji.

Priekš CNV analīzes tika importēti 30 *fastq* faili ar negatīvas kontroles paraugiem, kuri tika sagatavoti ar tādu pašu bibliotēkas izveidošanas reaģentu komplektu un nosekvencēti. Visiem paraugiem tika pārbaudīts un salīdzināts pārklājums, lai noteiktu drošu pārklājuma bāzes līniju, izmantojot kontroles. Importēti *fastq* faili tiek sakārtoti pret hg38 references genoma, izveidojot atsevišķus *Reads* failus. Tad CNV analīzes darbarīkā tika pievienots ar mērķa reģionu izsekošanas fails, kas ir nodrošināts no ražotāja, izveidotie *Reads* faili ar 30 negatīvas kontroles paraugi un 538 paraugi, kur katrs paraugs atsevišķi tika salīdzināts ar negatīvas kontroles grupu. Rezultāti tiek izvadīti vairākos formātos, tostarp reģiona līmeņa un mērķa līmeņa CNV ieraksti, gēna līmeņa anotācijas ieraksts un kopsavilkuma ziņojumi. Katra CNV izsaukuma ticamība tiek novērtēta, izmantojot absolūtās reizes izmaiņu metriku, un izteikta *p*-vērtībā.

2.7. Variantu interpretācija

Variantu interpretācijā primāri tika izmantota *BRCA Exchange* publiska pieejama variantu datubāze, kur ir pieejama variantu klīniskā nozīme, kas ir iegūta no ENIGMA konsorcijs ekspertu novērtējuma, meklējot pēc genomiskas pozīcijas un nukleotīda nomaiņas. Kā arī bija analizēta pieejama informācija par ziņotiem gadījumiem *ClinVar* datubāzē.

Ja variants nebija novērtēts ENIGMA konsorcijs ekspertiem un atrasts *BRCA Exchange* datubāzē, tad ģenētiskais variants tika meklēts *ClinVar* datubāzē, kur bija analizēta informācija par ziņotiem gadījumiem, un izmantots variantu interpretēšanas rīks *Franklin*, kur apvienotas vairākas datubāzes. Variantiem tika novērtēts biežums, izmantojot *GnomAD* datubāzi, kā arī ja variants bija ar aminoskābes nomaiņu, tad tika apskatīts Z vērtība, kas norāda vai gēns tolerē aminoskābes nomaiņas variantu vai nē, tad izmantojot *MetaDome* tika novērtēta varianta pozīcija tika tolerēti varianti ar aminoskābes nomaiņu. Izmantojot *ProteinPaint* datubāzi, tika novērtēta varianta lokalizācija – vai variants atrodas funkcionālā domēnā un vai ir ziņoti blakus patogēni vai ticami patogēni varianti. *UCSC Genome Browser* tika izmantots, lai novērtētu vai aminoskābe ir konservatīva. Izmantojot *SplaiiceAI Lookup* rīku tika paredzēta ietekme variantiem splaisinga vietās.

2.8. Patogēnu variantu validācija

Lai validētu identificētus klīniski nozīmīgus ģenētiskos variantus, tika veikta mērķa rajona amplifikācija ar iepriekš izveidotajiem oligonukleotīdiem (sk. 5.tab) un iegūto amplikonu sekvencēšana ar Sanger metodu. PĶR reakcijai sastāvēja no sekojošiem komponentiem – 0,2 µl 5 U Taq polimerāze, 5,0 µl 10x Taq bufferis, 2,0 µl 2,5 mM dNTP mix, 1,0 µl 10 µM katra praimera, 3,0 µl MgCl₂, 36,8 µl dH₂O un 1,0 µl izdalītās DNS (50 ng/µl). Reakcijas maisījumu novorteksēja, īsi nocentrifugēja un ievietoja PĶR iekārtā (Peqlab peqSTAR) un amplificēja pie sekojošiem apstākļiem - 95°C/5 min, tam seko 35 cikli : 95°C/30 sek, 55°C/45 sek, 72°C/1 min – pēc tam 72°C/5 min. Gatavs PĶR reakcijas produkts tika vizuāli pārbaudīts uz 1% agarozes gēla, uznesot 5,0 µl PĶR reakcijas produktu.

PĶR produktus attīrīja, samaisot 5,0 µl PĶR produkta ar 1,0 µl (1 u/mkl) FastAP un 0,5 µl (20 u/mkl) Exo I enzīmus, paraugus inkubēja PĶR iekārtā pie 37°C/15 min, 85°C/15 min. Attīrītiem PĶR produktiem veica sekvencēšanas reakciju, samaisot 2,5 µl attīrīta PĶR produkta pievienoja 2,0 µl 5xSeq bufera, 0,3 µl Big Dye, 1,0 µl praimera un 4,2 µl ūdens. Sagatavot0 sekvencēšanas reakciju ievietoja PĶR iekārtā, inkubēja pie sekojošiem apstākļiem - 95°C/2 min, tam seko 35 cikli : 95°C/20 sek, 55°C/15 sek, 60°C/4 min – pēc tam 72°C/40 sek un tad

4°C/5 min. Iegūtās sekvencēšanas reakcijas pārgulsnēja. Stobriņā ar 10,0 µl sekvencēšanas reakcijas pievienoja 7,25 µl ūdens, 1,5 µl 3 M NaOAc pH 5,2 un 31,25 µl 96% etanola un samaisīja. Sagatavotas reakcijas tika pārnestas optiskā platē, tad plate tika nocentrifugēta 40 min pie 3700 rcf un 4°C. Pēc centrifugēšanas plate tika uzmanīgi apgriezta bez plēves uz salvetes, lai atbrīvotos no supernatanta. Tad palikušas bedrītēs nogulsnes mazgā ar 70,0 µl 70% etanola un centrifūgē 15 min pie 3700 rcf un 4°C. Plate atkārtoti tika apgriezta bez plēves uz salvetes, lai atbrīvotos no supernatanta, un tad tika ievietota PĶR iekārtā uz 2 minūtēm pie 70°C žāvēties.

Bedrītēs ar sausām nogulsnēm tika pievienoti 10,0 µL HiDi formamīda un novorteksēti. Paraugus platē denaturēja 5 minūtes pie 95°C, 2 minūtes pie 4°C PĶR iekārtā. Sagatavota plate tika ievietota 8-kapilāra Applied Biosystems™ 3500 sērijas ģenētiskā analizatorā un tika veikta sekvencēšanas reakciju nolasīšana. Sekvencēšanas procesā iegūtie *abl* faili tika analizēti *CLC Genomics Workbench* 23.0.5 programmā, lai apstiprinātu identificētus variantus.

5. tabula.

Variantu mērķa rajona sekvencēšanai izveidotie oligonukleotīdi.

Oligonukleotīda nosaukums	Sekvence 5' – 3'	Variants
em474	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	c.5266dupC; c.5251C > T
em475	AGTCTTACCAAAATGAAGCGGCC	
em470	GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC	c.5117G>A; c.5095C > T
em471	GAGACCATTTTCCCAGCATC	
em456	CGTTGCTACCGAGTGTCTGTCTAAG	c.4035delA
em457	GTGCTCCCAAAAGCATAAA	
em494	ATTCACTGTGTTGATTGACCTT	c.658_659del
em495	GTTAGCAATTTC AACAGTCTAATC	
em464	TGGCTGCCCAGGAAGTATG	c.4675G > A
em465	AACCAGAATATCTTTATGTAGGA	
em560	CACTGTGCCTGGCCTGATAC	c.8572C > T
em561	AGTCTCTAAGACTTTGTTCTC	
em432	GGTTCTGATGACTCACATGATGGG	c.1371del
em433	TCTGTGGCTCAGTAACAAATGCTC	

CNV analīzes rezultātā paraugi, kuriem tika identificētas un novērtētas ar augstu ticamību lielās strukturālās izmaiņas *BRCAl* vai *BRCA2* gēnā, tika validēti ar MLPA metodi, izmantojot SALSA® MLPA® reaģentu komplektu pēc MRC Holland ražotāja norādījumiem.

No sākuma DNS paraugi tika denaturēti termociklerī pie 98°C 5 minūtes, tad tika sagaidīts kamēr temperatūra sasniedz 25°C. Katrā paraugā ar denaturēto DNS tika pievienoti 3,0 µL hibridizācijas maisījuma, kas sastāv no 1,5 µL MLPA bufera un 1,5 µL *probemix*, samaisīti ar pipeti un īsi nocentrifugēti, kas pēc tam tika novietoti atpakaļ termociklerī pie 95°C 1 minūte, kam seko 20 stundas hibridizācija pie 60°C. Tika sagatavots Ligase-65 maisījums, kas sastāv no 25,0 µL no nukleīnskābju brīvā ūdens, 3,0 µL ligāzes bufera A un 3,0 µL ligāzes bufera B. Tika sagaidīts, kad termociklerī temperatūra sasniedz 54°C, tad neizņemot stobriņus no iekārtas, katrā tika pievienoti 32,0 µL Ligase-65 maisījuma, samaisīts ar pipeti un aiztaisīts ciet. Tika turpināta termociklera programma, kur ligācijas reakcija notika 15 minūtes pie 54°C, 5 minūtes pie 98°C un apstājas pie 20°C. Tika pagatavots PĶR maisījums samaisot 7,5 µL no nukleīnskābju brīvā ūdens, 2,0 µL SALSA PĶR praimeru maisījuma un 0,5 µL SALSA polimerāzes. Stobriņi tika izņemti no amplifikatora un istabas temperatūrā tika pievienoti 10,0 µL PĶR maisījuma katrā paraugā, kārtīgi samaisot ar pipeti, kas uzreiz tika novietoti atpakaļ amplifikatorā pie sekojošiem apstākļiem - 35 cikli: 95°C/30 sek, 60°C/30 sek, 72°C/1 min – pēc tam seko 72°C 20 min.

Tālāk iegūta MLPA PĶR reakcija tika sagatavota fragmentu atdalīšanai ar kapilāro elektroforēzi, samaisot 0,7 µL PĶR reakcijas, 0,2 µL LIZ GS 500 size standard un 9,0 µL HiDi formamīda un tad denaturējot 3 minūtes pie 86°C, 2 minūtes pie 4°C. Sagatavota reakcija tika ievietota 8-kapilāra Applied Biosystems™ 3500 sērijas ģenētiskā analizatorā un fragmenti tika atdalīti ar kapilāro elektroforēzi. Iegūti faili ar rezultātiem tika analizēti un kvalitāte kontrole uztaisīta izmantojot *Coffalyser.Net* analīzes rīku.

2.9. Datu statistiskā analīze

Izmantojot *RStudio* 4.3 3 statistikas rīku, iegūtus pēc sekvenčēšanas 538 *variant calling* failus apvienoja vienā failā un no tā saskaitīja variantu sastopamību heterozigotiskā un homozigotiskā stāvoklī, skaitot unikālas kombinācijas pēc genomiskas pozīcijas, references alēles, alternatīvas alēles un zigotiskā stāvokļa.

Pēc iegūtām variantu sastopamības vērtībām analizētajā grupā aprēķina alternatīvas alēles biežumu, saskaitot kopā alēles heterozigotiskā un homozigotiskā stāvoklī, kas sadalīts ar kopējo alēļu skaitu pētījumā (1076).

Lai apskatītu un salīdzinātu alternatīvu alēļu sastopamību Latvijā ar citām valstīm bija izveidotā *heatmap*. Izrēķināta alternatīvas alēles biežumu starpība citām valstīm ar Latviju izteikta absolūtos skaitļos. Tālāk iegūtas vērtības normalizētas pa variantiem, pielietojot z -vērtības, kas no sākuma varianta biežuma standartnovirzi aprēķina pēc formulas (1.1):

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (1.1)$$

kur

s – alēles biežuma standartnovirze;

n – alēles biežuma vērtību skaits;

x_i – alēles biežuma vērtība, kas ir i populācijai;

$\bar{x}$ – vidējā vērtība starp alēles biežumiem populācijās;

Tad iegūto varianta biežuma standartnovirzi izmantoja varianta biežuma z -vērtības katrai populācijai, kuru aprēķina pēc formulas (1.2):

$$Z = \frac{x - \mu}{s} \quad (1.2)$$

kur

x – alēles biežuma vērtība

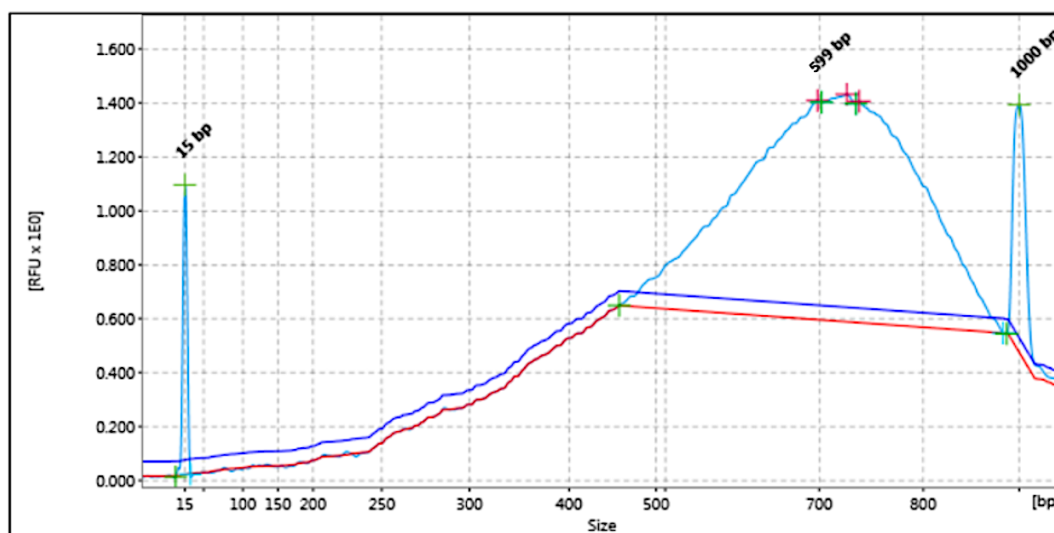
μ – vidējā alēles biežuma vērtība rindā

Iegūtas normalizētas pa variantiem z -vērtības iekrāsoja sarkana-zila gradientā, kur negatīvām vērtībām piešķirta zilās krāsas toņi, 0 vērtībai ir baltā krāsa un pozitīvām vērtībām piešķirta sarkanās krāsas toņi.

3. PĒTĪJUMA REZULTĀTI

3.1. DNS bibliotēku sagatavošana un sekvencēšana

Pētījuma ietvaros tika sagatavotas 538 DNS bibliotēkas atbilstoši 2.3. apakšnodaļā aprakstītajai metodikai, kuras kvalitāte tika pārbaudīta. Fluorometriski noteiktā DNS bibliotēku koncentrācija bija robežās no 10 ng/μL līdz 40 ng/μL pirms normalizēšanas, kā arī kapilārā elektroforēze uzrādīja vidēji līdz 600 bp lielu fargmentu garumu bez dimēru piesārņojuma, kas liecināja par labas kvalitātes rādītājiem priekš sekvencēšanai (sk. 3.att.).



3. att. Sagatavotas bibliotēkas elektroferogramma

Sagatavotas bibliotēkas tika normalizētas atbilstoši 2.4. apakšnodaļā aprakstītajai metodikai un *BRCA1* un *BRCA2* gēnu mērķtiecīga nākamās paaudzes sekvenēšana (NGS) tika veikta, izmantojot MiSeq platformu (Illumina, ASV) ar v3 600-cycles komplektu, ģenerējot 300 bp *paired-end* nolasījumus. Uz viena kārtidža tika izlaistīti 134 vai 135 unikāli indeksēti paraugi, kas multipleksēti vienā plūsmas šūnā.

Sekvencēšanas rezultātā tika iegūts vidēji 150 nolasījuma skaits ar vidējo nolasījuma dziļumu 300x katram paraugam gēnu garumā. Pamata sastāvs (A, T, C, G) bija līdzsvarots (25% ± 5%), kā arī *forward/reverse* nolasījumu līdzsvars bija vienmērīgs (~0,4–0,5). Sekvencēšanas kvalitāte visos paraugos bija nemainīgi augsta, vidējais *Phred* kvalitātes rādītājs (*Q-score*) >Q30 vairāk nekā 85-90 % no bāzēm, atspoguļojot bāzes noteikšanas precizitāti >99,9 %. Vidējais vienas bāzes kvalitātes rādītājs *forward* un *reverse* virzienā nolasītajām bāzēm bija aptuveni 37, kas norāda uz izcilu nolasījumu integritāti ar minimālu kļūdainu bāzu izsaukšanu. Pēc adapteru apgriešanas un kvalitātes filtrēšanas saglabāti vairāk nekā 70-80 % nolasījumu ar augstu izlīdzināšanas līmeni (>98 %) ar references genomu, kā arī netika novērots būtisks adapteru piesārņojums vai sekvencēšanas artefakti (<2%).

3.2. Variantu identificēšana un klasificēšana

Analīzes rezultātā iegūti 538 *variant calling* faili ar nofiltrētiem variantiem, no kuriem iegūti varianti tika klasificēti atbilstoši 2.7. apakšnodaļā aprakstītajai metodikai.

Izmantojot *RStudio* statistikas rīku, iegūta variantu sastopamība gan heterozigotiskā, gan homozigotiskā stāvoklī pētījuma ietvaros. Pētījumā identificēti 121 atšķirīgs variants, kur identificēti 120 (99,17%) heterozigotiskā stāvoklī un 1 (0,83%) homozigotiskā stāvoklī. No 120 variantiem heterozigotiskā stāvoklī 26 (21,67%) ir arī novēroti homozigotiskā stāvoklī, izveidojot kopā 147 dažādas variācijas.

Variantu īpatsvars *BRCA1* gēnā bija 45,45% (n=55), bet variantu īpatsvars *BRCA2* gēnā bija 54,55% (n=66), kas ir atspoguļots ar variantu lokalizāciju 6.1. tabulā un 6.2. tabulā. Tikai 45,45% (n=25) variantu *BRCA1* gēnā bija identificēti proteīna kodējošos reģionos, bet 54,55% (n=30) variantu nekodējošos reģionos. *BRCA2* gēnā 57,58% (n=38) variantu lokalizēti proteīna kodējošos reģionos un 42,42% (n=28) lokalizēti proteīna nekodējošos reģionos.

6.1. tabula

Variantu lokalizācija <i>BRCA1</i> gēnā	
Varianta lokalizācija gēnā	Variantu skaits
5'UTR	1
3'UTR	13
introns	16
7. eksons	1
8. eksons	1
10.eksons	15
12.eksons	1
14.eksons	1
15.eksons	3
16.eksons	1
17.eksons	1
19.eksons	1
Kopā	55

Variantu lokalizācija *BRCA2* gēnā

Variantu lokalizācija gēnā	Variantu skaits
5'UTR	2
3'UTR	20
introns	6
3. eksons	1
8. eksons	1
10.eksons	6
11.eksons	21
14.eksons	1
16.eksons	1
18.eksons	2
20.eksons	1
23.eksons	1
27.eksons	3
Kopā	66

Izmantojot datubāzes 83 (68,59%) tika klasificēti kā labdabīgi, 24 (19,83%) kā ticami labdabīgi, 7 (5,79%) kā varianti bez skaidra nozīmīguma (VUS) un 7 (5,79%) kā patogēni, kuri ir apkopoti 4.1.- 4.4. pielikumos.

Starp klīniski nenozīmīgiem variantiem (labdabīgi, ticami labdabīgi un VUS) *BRCA1* gēnā lielāka daļa 60% sastāv no viena nukleotīda nomaiņas variantiem un 40% delēcijas. Savukārt, *BRCA2* gēnā novērojami 76,56% variantu ar viena nukleotīda nomaiņu, 17,19% delēcijas, 3,13% insercijas un 3,13% indelu (sk. 6.3.tab.).

6.3.tabula

Variantu skaits *BRCA1* un *BRCA2* gēnos

Variantu veids	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
delēcija	20	11
insersija	-	2
delēcija un insercija	-	2
SNV	30	49

Proteīna kodējošos reģionos *BRCA1* gēnā klīniski nenozīmīgiem variantiem ap 65% novērota aminoskābes nomaiņa un 35% variantu bez aminoskābes nomaiņas. *BRCA2* gēnā starp klīniski nenozīmīgiem variantiem proteīna kodējošos reģionos 50% novērota aminoskābes nomaiņa, 44,44% variantu bez aminoskābes nomaiņas, 2,78% STOP kodona veidojošu variantu un 2,78% rāmju nobīdes, kas novērojams 6.4.tabulā.

6.4. tabula

Klīniski nenozīmīgu variantu skaits pēc ietekme molekulārā līmenī *BRCA1* un *BRCA2* gēnos

Varianta ietekme molekulārā līmenī	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
STOP kodonu veidojošs	-	1
aminoskābes nomaiņa	13	18
rāmju nobīde	-	1
bez aminoskābes nomaiņas	7	16

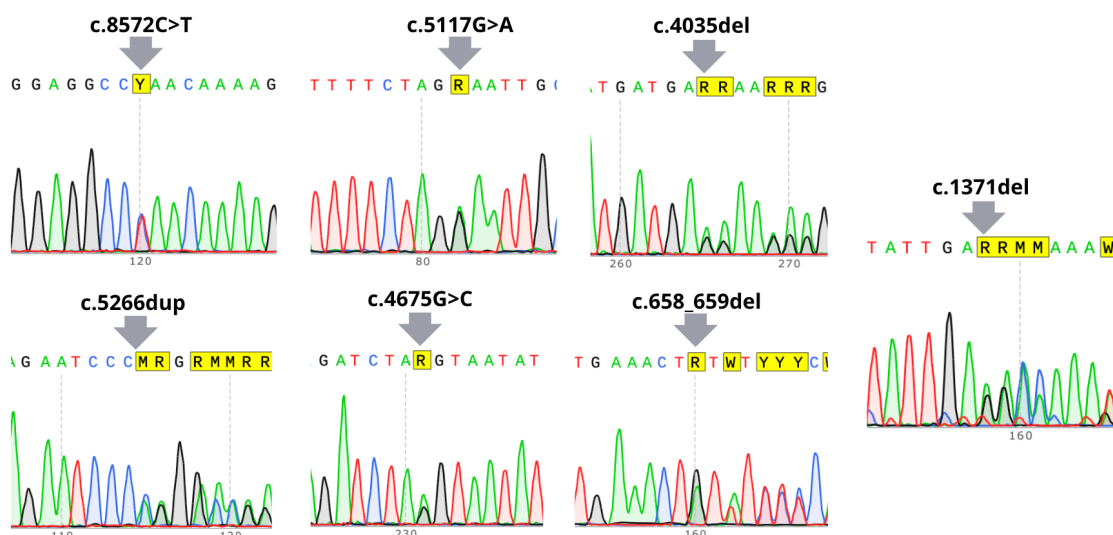
Katram labdabīgam, ticami labdabīgam un VUS variantam izrēķināts alēļu biežums, ņemot vērā ka daži varianti novērojami arī homozigotiskā stāvoklī, kas nozīmē, ka ir divas alternatīvas alēles. Rezultātā, saskaitot visu alternatīvu alēļu skaitu un sadalot to ar kopēju alēļu skaitu, iegūta tabula ar variantu alēles biežumu pētījumā, kas ir novietota 5.1.-5.2. pielikumos.

Lai apstiprinātu klīniski nozīmīgus ģenētiskus variantus (rs80359112, rs80356860, rs80356988, rs80357711, rs397508861, rs80359604 un rs80357906), kuri ir aprakstīti 6.5.tabulā, mērķa reģioni tika amplificēti un nosekvencēti ar Sangera metodi atbilstoši 2.8. apakšnodaļai (sk. 4.att.).

6.5. tabula

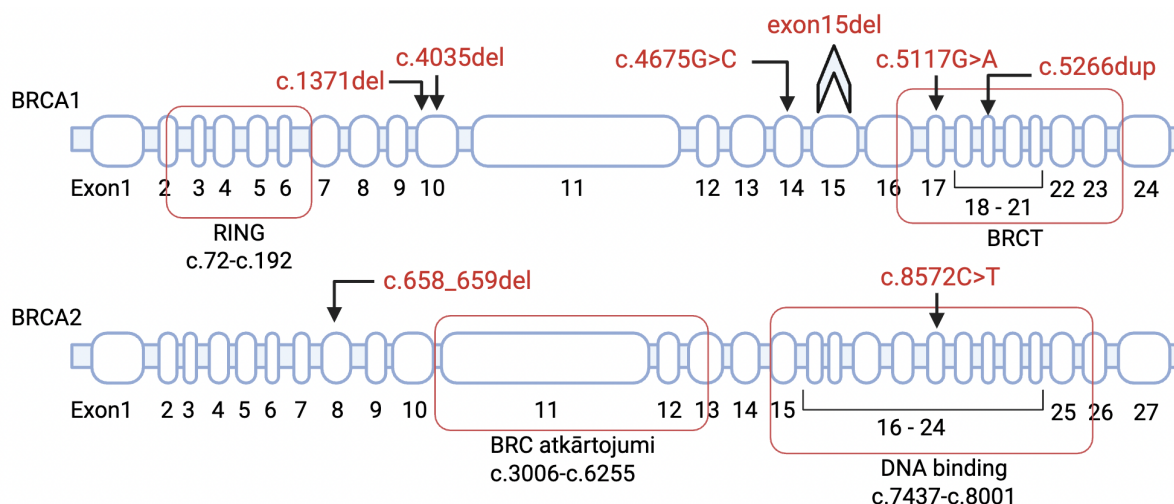
Identificēti klīniski nozīmīgi ģenētiski varianti.

Varianta ietekme molekulārā līmenī	dbSNP datubazes Nr.	HGVS nomenklatūra
STOP kodonu veidojošs	rs80359112	NM_000059.4(BRCA2):c.8572C>T (p.Gln2858Ter)
aminoskābe nomaiņa	rs80356860	NM_007294.4(BRCA1):c.5117G>A (p.Gly1706Glu)
aminoskābe nomaiņa	rs80356988	NM_007294.4(BRCA1):c.4675G>C (p.Glu1559Gln)
rāmju nobīde	rs80357711	NM_007294.4(BRCA1):c.4035del (p.Glu1346fs)
rāmju nobīde	rs397508861	NM_007294.4(BRCA1):c.1371del (p.Asp458fs)
rāmju nobīde	rs80359604	NM_000059.4(BRCA2):c.658_659del (p.Val220fs)
rāmju nobīde	rs80357906	NM_007294.4(BRCA1):c.5266dup (p.Gln1756fs)



4. Att. Variantu validācija ar Sangera sekvencēšanu. *BRCA1* gēnā: c.5117G>A, .4675G>C, c.4035del, c.1371del, c.5266dup. *BRCA2* gēnā: c.8572C>T, c.658_659del.

Pētījumā tika apstiprināti visi 7 klīniski nozīmīgi ģenētiski varianti, kur pieci varianti lokalizēti *BRCA1* gēnā (71,43%) un divi *BRCA2* gēnā (28,57%) (sk. 5.att.). Varianti ar rāmju nobīdi *BRCA1* gēnā c.4035del, c.1371del, c.5266dup un *BRCA2* gēnā c.658_659del izveidoja 57,14% no patogēniem variantiem. Varianti ar aminoskābes nomaiņu *BRCA1* gēnā c.5117G>A un c.4675G>C izveidoja 28,57% un STOP kodonu veidojošs variants *BRCA2* gēnā c.8572C>T izveidoja 14,29% no identificētiem patogēniem variantiem pētījumā.



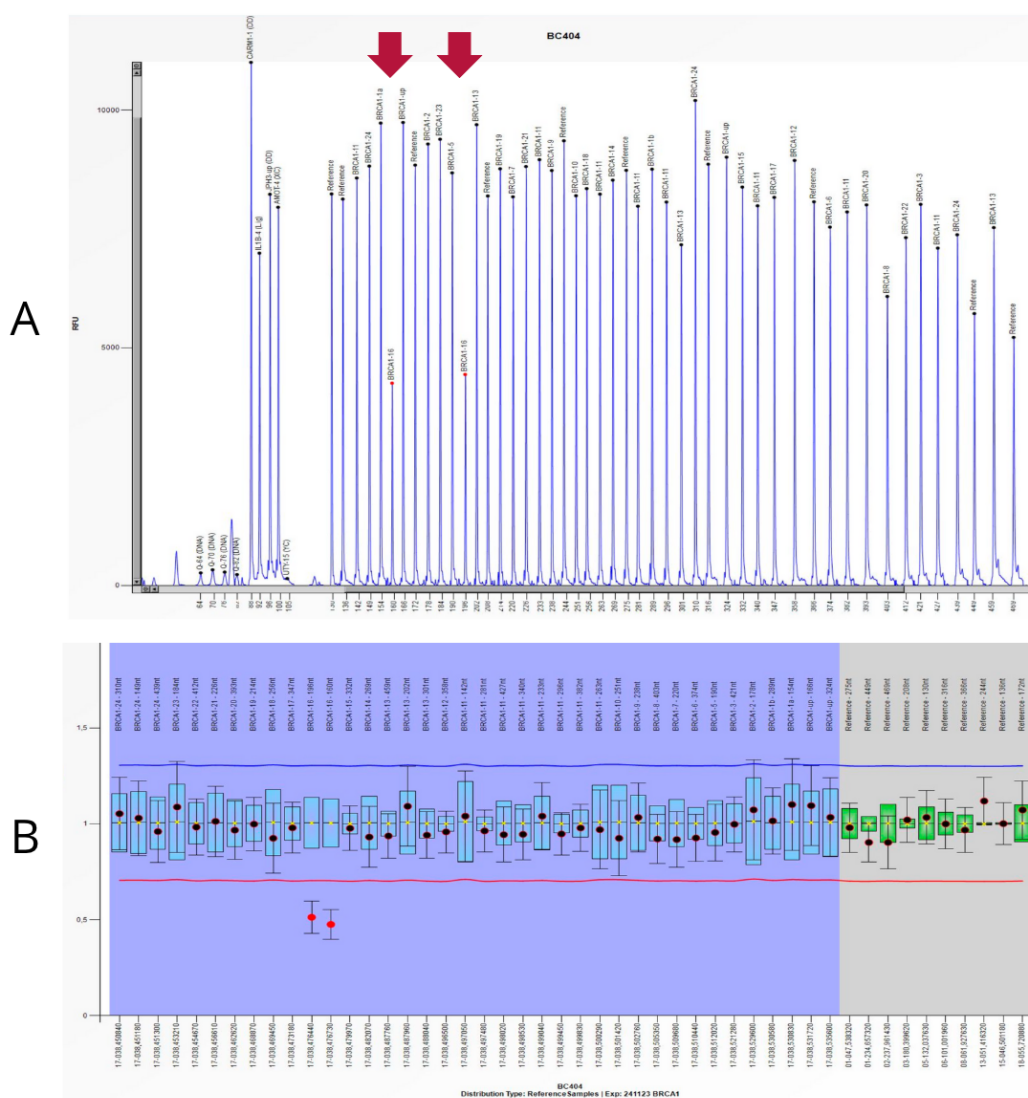
5. Att. Identificēto patogēnu variantu lokalizācija *BRCA1* un *BRCA2* gēnos.

CNV analizē lielās strukturālās izmaiņas ar augstu ticamību (p -vērtība $<0,05$ un fold change $>1,5$) tika identificēti 12 paraugiem, kuri tika pārbaudīti ar MLPA metodi atbilstoši 2.8.

Pētījumā 8 no 538 dalībniekiem (1,48%) tika identificēti klīniski nozīmīgi ģenētiskie varianti *BRCA1* un *BRCA2* gēnos.

Identificēta klīniski nozīmīga lielā strukturāla izmaiņa *BRCA1* gēnā.

Gēns	CNV veids	Cita nomenklatūra	HGVS nomenklatūra
<i>BRCA1</i>	delēcija	15 eksona delēcija	NG_005905.2:g.43068781_43073429del



6. Att. Lielā strukturāla izmaiņa ar 15.eksona delēciju **A.** MLPA elektroferogramma. **B.** MLPA rezultāts

3.3. *BRCA1* un *BRCA2* variantu sastopamība un salīdzinājums ar citām populācijām

Vairāki labdabīgi varianti atkārtojas starp dalībniekiem analizējamā grupā, tāpēc pētījuma ietvaros saskaitīta *BRCA1* un *BRCA2* variantu sastopamība grupā, kas sevī ietver 538 dalībniekus, un salīdzināta to ar citām populācijām. Katram variantam saskaitīts alternatīvas alēles biežums un, izmantojot dbSNP datubāzi, tika apkopoti pieejamie dati pār variantu sastopamību citās populācijās, kas ir apkopoti un atspoguļoti Nr. pielikumā. Variantu sastopamības salīdzinājuma tika izmantoti dati no Igaunijas, Korejas, Somijas, Nīderlandes, Zviedrijas, Japānas un Spānijas.

No 114 klīniski nenoīmīgiem variantiem tikai par 57 (50%) bija pieejami dati ar alternatīvas alēles biežumu citās valstīs. Rezultātā no iegūtiem alēļu biežumiem uztaisīta *heatmap* atbilstoši 2.9. apakšnodaļai, kas ir ievietota 6.pielikumā, kur novērojama tendence *BRCA1* un *BRCA2* variantu sastopamības līdzībā ar Igaunijas populāciju.

DISKUSIJA

Pārmantots krūts un olnīcu vēzis (HBOC), ko galvenokārt izraisa patogēnie *BRCA1* un *BRCA2* gēnu varianti, ir nozīmīga sabiedrības veselības problēma, jo mutāciju nēsātājiem ir paaugstināts vēža risks mūža laikā [59]. Latvijā katru gadu vismaz 55 krūts vēža gadījumi un 24 olnīcu vēža gadījumi būtu potenciāli jau iepriekš paredzami *BRCA1/2* patogēna variantu nēsātājiem [4;25;73;78]. Agrīna nēsātāju identificēšana, izmantojot ģenētisko testēšanu, ļauj īstenot personalizētas riska pārvaldības stratēģijas, tostarp pastiprinātu uzraudzību, profilaktiskas operācijas un mērķtiecīgu terapiju, kas galu galā samazina saslimstību ar vēzi un mirstību [4].

Latvijā līdz šim veikti pētījumi, kas galvenokārt fokusējās uz *BRCA1* un *BRCA2* gēnu klīniski nozīmīgu variantu noteikšanu pacientēm ar krūts un/vai olnīcu vēzi un viņu tuvu radniekiem, lai izprastu to izplatību, spektru un klīnisko nozīmi vēža riska novērtēšanā un ģenētiskajā konsultēšanā [6;7;25;47;78]. Šī pētījuma mērķis bija noteikt *BRCA1* un *BRCA2* variantu īpatsvaru starp onkoloģiski veselām sievietēm Latvijas populācijā, izmantojot nākamās paaudzes sekvenčēšanas (NGS) tehnoloģiju. Rezultātā novērots augstāks patogēno variantu īpatsvars *BRCA1* un *BRCA2* gēnos (1:67 vai 1,49%) nekā bija sagaidāms, jo literatūrā norādīts variantu biežums *BRCA1/2* gēnos ir aptuveni 1:400 (0,2%- 0,3%) vispārējā populācijā, izņemot Aškenazi ebreju tautības populāciju, kur prevalence aptuveni ir 1:40 (2%-2,5%) [59;62]. Pētījumā novēroto augsto patogēno *BRCA1/2* variantu izplatību var izskaidrot ar atlases neobjektivitāti analizētā grupā, jo dalībnieki, iespējams, bija vairāk motivēti piedalīties, jo ģimenē ir bijuši vēža gadījumi, tādējādi palielinot iedzimto variantu atklāšanas iespējamību.

Starp identificētiem patogēniem variantiem noteikti trīs ciltstēva varianti: c.5117G>A (p.Gly1706Glu), c.5266dup (p.Gln1756fs) un c.4035del (p.Glu1346fs) *BRCA1* gēnā. Aptuveni 80 % no visiem identificētajiem patogēniem variantiem *BRCA1* gēnā krūts un olnīcu vēža pacientiem Baltijas reģionā ir saistīts c.5266dup un c.4035del variantiem, tāpēc tas bija sagaidāms kā kāds no šiem variantiem varētu būt identificējams pētījumā [6;47]. *BRCA1* c.5266dup (p.Gln1756fs) variants 19. eksonā, vēsturiski dēvēts par 5382insC, ir patogēns variants ar rāmja nobīdi *BRCA1* gēnā [6]. Šī mutācija ietver citozīna nukleotīda dublēšanos 5266. pozīcijā, kā rezultātā rodas priekšlaicīgs STOP kodons 74. pozīcijā un saīsināts, nefunkcionāls BRCA1 proteīns [6;47]. BRCA1 c.4035delA ir otra izplatītākā BRCA1 mutācija Latvijā pēc c.5266dup, kur līdzīgi delēcija 4035. pozīcijā 10. eksonā izraisa rāmju nobīdi un ievieš priekšlaicīgu STOP kodonu, radot saīsinātu BRCA1 proteīnu un audzēja supresora funkcijas zudumu [6;47;78]. Salīdzinājumā ar c.4035del variantu nēsātājiem, c.5266dup variantu nēsātājiem izdzīvošanas rādītāji ir labāki krūts vēža gadījumā, jo agresīvs audzēja

apakštips biežāk bija novērots c.4035del variantā nēsātājiem [6]. Variants ar aminoskābes nomaiņu c.5117G>A ir trešais bieži sastopams variants Latvijā, kurš ir populācijas specifisks patogēns variants, jo ir reti sastopams pasaulē, bet Latvijā un Spānijā ir reģistrēti vairāki gadījumi [19;47]. Šis variants kā c.5266dup atrodas BRCT domēnā, kas ir kritiski svarīgs DNS bojājumu atbildes reakcijai un olbaltumvielu-olbaltumvielu mijiedarbībai [36;57]. Šis variants izraisa BRCA1 funkcijas zudumu, kā rezultātā traucēta DNS labošana un paaugstinājās risks saslimst ar vēzi [47]. Iepriekš pētījumos novērota genotipa-fenotipa korelācija, kas norāda, ka dažādi varianti *BRCA1* gēnā var izraisīt atšķirīgu vēža risku un klīnisko izpausmi [6;65;78]. Tādi varianti kā c.5266dup, kuri lokalizēti *BRCA1* gēna 3' daļā, ir saistīti ar augstu krūts vēža attīstības risku, bet c.4035del variantam tika novērots gandrīz vienāds krūts un olnīcu vēža īpatsvaru starp variantā nēsātājiem [6].

Pētījumā identificēts vēl viens klīniski nozīmīgs variants ar aminoskābes nomaiņu - c.4675G>C (p.Glu1559Gln) *BRCA1* gēnā. Šis variants bija detektēts 5 no 164 (3,0%) *BRCA1/2* pārbaudītajām ģimenēm iepriekšējā pētījumā Latvijā [78] un vēl divām ģimenēm no citiem pētījumiem [7;47], kas kopumā veido vislielāko reģistrēto gadījumu skaitu ar c.4675G>C (p.Glu1559Gln) variantu pasaulē [37;47]. Šis variants atrodas *BRCA1* gēna 14. eksona galā, proteīna centrālajā apgabalā, bet ārpus visvairāk izpētītajiem funkcionālajiem domēniem (RING un BRCT domēni) [36]. Tā ka variants ir rets, pietrūka informācijas par variantu.

BRCA2 gēnā detektēti tikai divi varianti: c.8572C>T (p.Gln2858Ter) un c.658_659del (p.Val220fs). Tas ir bija sagaidāms, jo no patogēniem variantiem saistītiem ar HBOC 66% ir lokalizēti *BRCA1* gēnā un 34% *BRCA2* gēnā [33;41]. Variants ar rāmju nobīdi c.658_659del (p.Val220fs), kurš iepriekš bija novērots Latvijā: pētījumā bija identificēts variants vienam pacientam HBOC grupā un četriem no secīgas krūts vēža pacientu grupas [7]. Latvijā un Lietuvā šis variants ir viens no visbiežāk novērotiem variantiem *BRCA2* gēnā [47]. Kā arī šis variants ir ziņots pētījumos Norvēģijā [34], Polijā [21;48;63;84], Itālijā [67], Spānijā [19], Austrijā [75] un Baltkrievijā [69]. Vienīgais klīniski nozīmīgs STOP kodonu veidojošs variants c.8572C>T (p.Gln2858Ter), kas ir rets variants, detektēts vienai ģimenei iepriekšējā pētījumā Latvijā [47]. Ir ziņoti divi gadījumi Lietuvā un Igaunijas pētījumā c.8572C>T bija biežākais no detektētiem variantiem *BRCA2* gēnā [38;46;66;74]. Pieejama informācija ir ierobežotā, jo ir maz publicēto datu pār šo variantu. Tā kā c.8572C>T ir reti sastopams visā pasaulē, bet ir konstatēts Baltijas reģionā, būtu vērtīgi izpētīt sīkāk iespējamo ciltstēva efektu Baltijas reģiona populācijās, lai sniegtu ieskatu par reģionālo vēža risku saistībā ar c.8572C>T *BRCA2* gēnā.

Viens no pārsteigumiem pētījumā bija identificēts patogēns variants c.1371del (p.Asp458fs) *BRCA1* gēnā. Šis variants nebija identificēts iepriekš Latvija, kā arī Baltijas reģionā [47]. Klīniski nozīmīgs variants ar rāmju nobīdi atrodas 10. eksonā, kur arī atrodas

c.4035del variants. Nav publiski pieejami dati pār varianta biežumu, kā arī nav publicēti raksti, kur c.1371del būtu identificēts. Neskatoties uz to, ka variants ir rets, tas tika klasificēts 2016. gadā ENIGMA konsorcijs ekspertiem kā patogēns variants [55]. Kā arī plašā pētījumā, kur piedalījās 13213 sievietes ar identificētiem patogēniem variantiem *BRCA1/2* gēnos no visas pasaules un ir iesaistītas CIMBA, tika iekļautas 10 sievietes ar c.1371del (p.Asp458fs) *BRCA1* gēnā, bet nav publiski pieejami dati pār varianta nēsātājiem, lai apskatītu un novērtētu reģionālo izvietojumu vai gadījumu aprakstu [60].

CNV analīzes rezultātā tikai vienam no 12 (8,33%) tika apstiprināta ar MLPA metodi liela strukturāla izmaiņa, kas liecina par lielu aplami pozitīvu CNV analīzes rezultātu skaitu. Iespējamie iemesli zema CNV noteikšanas precizitātei varētu būt bāzes līnija vai pārklājuma svārstīgums. Darbā tika izmantoti 30 negatīvas kontroles paraugi priekš bāzes līnijas izveidošanai, bet priekš stabilai bāzes līnijai tas varētu būt nepietiekami, jo tās bija ieteicams minimālais paraugu skaits [39;70]. Atšķirības bibliotēkas sagatavošanā un sekvencēšanas procesos varētu būt izskaidrojumam nolasījumu skaita mainību paraugos, jo bibliotēku sagatavošana nebija automatizēta un bija iesaistīti vairāki cilvēki, kā arī paraugu sekvencēšana tika iedalīta četros piegājienos. Tas tikai pierada, ka validācija ir nepieciešama, bet tādai validācijas metodei kā MLPA var būt arī trūkumi un riski, piemēram, nejauši atklāt patogēnu variantu citā gēnā, kurš ir iekļauts kopā ar interesējošajiem gēniem komerciāli ražotā MLPA reaģentu komplektā. Pētījuma ietvaros tika identificēta liela strukturāla izmaiņa – 15. eksona delēcija *BRCA1* gēnā, kas tika interpretēta kā klīniski nozīmīga, jo abi lūzuma punkti atrodas kodēšanas apgabalā, kas visticamāk izjauc olbaltumvielas funkciju, un vismaz 80 % variantu pārklājas ar ziņotām patogēnām vai ticami patogēnām strukturālām izmaiņām (ClinVar ID: 267559, ClinVar ID: 2692393). Literatūrā tika norādīts, ka 11-13% no identificētiem klīniski nozīmīgiem variantiem *BRCA1* gēnā ir lielas strukturālas izmaiņas [59]. Pētījumā rezultātā 15. eksona delēcija veido 16,67% (1:6) no identificētiem klīniski nozīmīgiem variantiem *BRCA1* gēnā.

Lielāka daļa no identificētiem variantiem klasificēti kā labdabīgi (84) un ticami labdabīgi (23), kur pamatā ir klusie un varianti ar aminoskābes nomaiņu. Starp tiem *BRCA2* gēnā tika noteikts 1,49% (8:538) dalībnieku variants ar rāmju nobīdi c.10095delinsGAATTATATCT (p.Ser3366fs) un 0,56% (3:538) dalībnieku STOP kodonu veidojošs variants c.9976A>T (p.Lys3326Ter), kas ir salīdzinoši augsta sastopamība grupā. Citā pētījumā tika novērots augstāks c.9976A>T un c.10095delinsGAATTATATCT variantu biežums pacientiem ar diagnosticētu krūts vai olnīcu vēzi salīdzinājumā ar kontroles grupu, bet netika noteikta statistiski ticama saistība ar vēzi [12;76]. Varianti klasificēti kā ticami labdabīgs un labdabīgs, jo abi divi atrodas pēdējā eksonā un tika paredzēts pēc funkcionālā novērtējuma,

ka priekšlaicīgi izveidota STOP kodona dēļ nedaudz saīsināts BRCA2 proteīns nezaudē savu funkciju [12;76].

Pētījuma rezultātā identificēti 7 ģenētiski varianti ar neskaidru klīnisku nozīmi (VUS). Ņemot vērā jaunas variantu klasificēšanas vadlīnijas un Beijesa uz punktiem balstīta sistēmu [], identificēti VUS varianti klasificēti kā “auksti”, kā arī tie tika identificēti onkoloģiski veselām sievietēm, tāpēc pēc visām rekomendācijām varianti netika ziņoti.

Apkopojot datus par alēles biežumu citās populācijās, novērojama tendence *BRCA1* un *BRCA2* variantu sastopamības līdzībā ar Igaunijas populāciju, kas bija sagaidāms, jo iepriekšējā pētījumā parādīta ģenētiskā līdzība Igaunijas populācijai ar Latvijas un Lietuvas populācijām [53]. Lielākai daļai no apskatītiem labdabīgiem un VUS variantiem bija pieejami dati par biežumu Igaunijas populācijā, kad citu populāciju datus nebija pieejamas informācija par biežumu 30-50% variantu. Salīdzinot klīniski nozīmīgus variantus, Igaunijas populācijai ir līdzīgi biežāki identificēti varianti c.5266dup (p.Gln1756fs) un c.4035del (p.Glu1346fs) *BRCA1* gēnā, bet variantu sastopamība daudz zemāk nekā Latvijā [46]. Pēc publicētiem datiem par biežākiem patogēniem variantiem *BRCA1* un *BRCA2* gēnos valstīs, Latvijai tuvāk Polija un Lietuva ar līdzīgo c.5266dup (p.Gln1756fs), c.4035del (p.Glu1346fs) un c.181T>G (p.Cys61Gly) variantu sastopamību [60]. Tā kā viens no ierobežojumiem darbā bija publicētu datu trūkums par labdabīgu un VUS variantu biežumu citās valstīs kā Lietuvā un Polijā. Kā arī pieejami alēļu biežuma dati nav vienlīdzīgi, jo alēļu biežums, piemēram, Korejā ir izrēķināts no projekta ar 3117 dalībnieku, bet Somijā biežums izrēķināts no projekta ar 152 dalībnieku.

Pētījumā iegūti dati par alternatīvu alēļu biežumu Latvijā var kalpot kā pamats nacionālai *BRCA1/2* variantu biežuma datubāzei, kas būtu ļoti noderīga klīniskajā praksē. Kā arī ir plānots publicēt biežuma datus dbSNP datubāzē, lai paplašinātu informāciju par tādiem variantiem kā VUS, kas varētu palīdzēt citiem korekti interpretēt tādus variantus, ņemot vērā biežumu onkoloģiski veselai populācijai, padarīt to par labdabīgu.

SECINĀJUMI

1. Identificēti 7 klīniski nozīmīgi ģenētiskie varianti *BRCA1* un *BRCA2* gēnos.
2. Identificēta viena klīniski nozīmīga liela strukturāla izmaiņa *BRCA1* gēnā.
3. Onkoloģiski veselām sievietēm ir novērots augstāks patogēno variantu īpatsvars *BRCA1* un *BRCA2* gēnos nekā bija sagaidāms.
4. Identificēti 83 labdabīgi varianti, 24 ticami labdabīgi varianti un 7 VUS, pēc kuriem novērota līdzība *BRCA1* un *BRCA2* variantu biežumā ir ar Igaunijas populāciju.

PATEICĪBAS

Vislielākā pateicība mana darba vadītājai prof. *Dr. med. Zandai Danebergai* par padomiem, pacietību, ieguldīto laiku, sapratni un atbalstu darba izstrādē un sagatavošanā.

Vēlos izteikt pateicību saviem kolēģiem no Rīgas Stradiņa universitātes Onkoloģijas un molekulārās ģenētikas institūta Elizabetei Liepiņai, Norai Kriķei, Kristinei Vīksnei un Rolandam Ciematniekam par nenovērtējamo palīdzību darba izstrādē.

Vissirsnīgākais paldies *Lindex Latvia* Rozā lentītes kampaņas ziedojumam, *Longenesis* uzņēmumam un *E. Gulbja* laboratorijas darbiniekiem par projekta atbalstu un sadarbību.

Esmu arī ļoti pateicīga pētījuma dalībniekiem par dalību projektā.

IZMANTOTIE LITERATŪRAS AVOTI

1. Aguilar, D., Garza-Rodríguez, M. L., Muñiz-Garza, C. E., Nuñez, F. A., Villarreal-Garza, C. M., Vidal-Gutiérrez, O., Pérez-Ibave, D. C., & Burciaga-Flores, C. H. (2025). Los olvidados: Non-BRCA variants associated with Hereditary breast cancer in Mexican population. *Breast Cancer Res*, 27(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13058-024-01957-9>
2. Anantha, R. W., Simhadri, S., Foo, T. K., Miao, S., Liu, J., Shen, Z., Ganesan, S., & Xia, B. (2017). Functional and mutational landscapes of BRCA1 for homology-directed repair and therapy resistance. *ELife*, 6, e21350. <https://doi.org/10.7554/eLife.21350>
3. Andreassen, P. R., Seo, J., Wiek, C., & Hanenberg, H. (2021). Understanding BRCA2 Function as a Tumor Suppressor Based on Domain-Specific Activities in DNA Damage Responses. *Genes*, 12(7), 1034. <https://doi.org/10.3390/genes12071034>
4. Baltiņa, D., Bērziņa Geriņa, A., Plaudis, H. et al. Latvijā biežāk sastopamo audzēju primārā un metastāžu terapija Krūts vēzis (C50) ALGORITMI. SPKC, 2020.
5. Barili, V., Ambrosini, E., Bortesi, B., Minari, R., de Sensi, E., Cannizzaro, I. R., Taiani, A., Michiara, M., Sikokis, A., Boggiani, D., Tommasi, C., Serra, O., Bonatti, F., Adorni, A., Luberto, A., Caggiati, P., Martorana, D., Uliana, V., Percesepe, A., ... Pellegrino, B. (2024). Genetic Basis of Breast and Ovarian Cancer: Approaches and Lessons Learnt from Three Decades of Inherited Predisposition Testing. *Genes*, 15(2), 219. <https://doi.org/10.3390/genes15020219>
6. Berga-Švītiņa, E., Maksimenko, J., Miklaševičs, E., Fischer, K., Vilne, B., & Mägi, R. (2023). Polygenic Risk Score Predicts Modified Risk in BRCA1 Pathogenic Variant c.4035del and c.5266dup Carriers in Breast Cancer Patients. *Cancers*, 15(11), 2957. <https://doi.org/10.3390/cancers15112957>
7. Berzina, D., Nakazawa-Miklasevica, M., Zestkova, J., Aksenoka, K., Irmejs, A., Gardovskis, A., Kalniete, D., Gardovskis, J., & Miklasevics, E. (2013). BRCA1/2 mutation screening in high-risk breast/ovarian cancer families and sporadic cancer patient surveilling for hidden high-risk families. *BMC medical genetics*, 14, 61. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-61>
8. Bewicke-Copley, F., Arjun Kumar, E., Palladino, G., Korfi, K., & Wang, J. (2019). Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1348–1359. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.10.004>
9. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May-Jun;74(3):229-263. doi: 10.3322/caac.21834. Epub 2024 Apr 4. PMID: 38572751.
10. Bouras, A., Guidara, S., Leone, M., Buisson, A., Martin-Denavit, T., Dussart, S., Lasset, C., Giraud, S., Bonnet-Dupeyron, M.-N., Kherraf, Z.-E., Sanlaville, D., Fert-Ferrer, S., Lebrun, M., Bonadona, V., Calender, A., & Boutry-Kryza, N. (2023). Overview of the Genetic Causes of Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome in a Large French Patient Cohort. *Cancers*, 15(13), 3420. <https://doi.org/10.3390/cancers15133420>
11. Brouwer, C., Vu, T., Zhou, M., Cardinali, G., Welling, M., Wiele, N., & Robert, V. (2016). Current Opportunities and Challenges of Next Generation Sequencing (NGS) of DNA; Determining Health and Diseases. *BBJ*, 13(4), 1–17. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2016/25662>
12. Butz, H., Papp, J., Bozsik, A., Krokker, L., Pócza, T., Oláh, E., & Patócs, A. (2021). Application of Multilayer Evidence for Annotation of C-Terminal BRCA2 Variants. *Cancers*, 13(4), 881. <https://doi.org/10.3390/cancers13040881>
13. Castéra, L., Krieger, S., Rousselin, A., Legros, A., Baumann, J.-J., Bruet, O., Brault, B., Fouillet, R., Goardon, N., Letac, O., Baert-Desurmont, S., Tinat, J., Bera, O., Dugast, C.,

- Berthet, P., Polycarpe, F., Layet, V., Hardouin, A., Frébourg, T., & Vaur, D. (2014). Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet*, 22(11), 1305–1313. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.16>
14. Çelik, A., Acar, M., Moroski Erkul, C., Gunduz, E., & Gunduz, M. (2015). Relationship of Breast Cancer with Ovarian Cancer. In M. Gunduz (Ed.), *A Concise Review of Molecular Pathology of Breast Cancer*. InTech. <https://doi.org/10.5772/59682>
 15. Chin, E. L., da Silva, C., & Hegde, M. (2013). Assessment of clinical analytical sensitivity and specificity of next-generation sequencing for detection of simple and complex mutations. *BMC Genet*, 14(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-6>
 16. Crooks, K. R., Farwell Hagman, K. D., Mandelker, D., Santani, A., Schmidt, R. J., Temple-Smolkin, R. L., & Lincoln, S. E. (2023). Recommendations for Next-Generation Sequencing Germline Variant Confirmation. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 25(7), 411–427. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2023.03.012>
 17. Dahui, Q. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med*, 16(1), 4–10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>
 18. D'Argenio, V., Esposito, M. V., Telese, A., Precone, V., Starnone, F., Nunziato, M., Cantiello, P., Iorio, M., Evangelista, E., D'Aiuto, M., Calabrese, A., Frisso, G., D'Aiuto, G., & Salvatore, F. (2015). The molecular analysis of BRCA1 and BRCA2: Next-generation sequencing supersedes conventional approaches. *Clinica Chimica Acta*, 446, 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.03.045>
 19. de Juan, I., Palanca, S., Domenech, A. et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in males with familial breast and ovarian cancer syndrome. Results of a Spanish multicenter study. *Familial Cancer* 14, 505–513 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10689-015-9814-z>
 20. del Vecchio, F., Mastroiaco, V., di Marco, A., Compagnoni, C., Capece, D., Zazzeroni, F., Capalbo, C., Alesse, E., & Tessitore, A. (2017). Next-generation sequencing: recent applications to the analysis of colorectal cancer. *J Transl Med*, 15(1), 246. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1353-y>
 21. Doraczynska-Kowalik, A., Michalowska, D., Matkowski, R., Czykalko, E., Blomka, D., Semeniuk, M., Abrahamowska, M., Janus-Szymanska, G., Mlynarczykowska, P., Szynglarewicz, B., Pawlak, I., Maciejczyk, A., & Laczmanska, I. (2022). Detection of BRCA1/2 pathogenic variants in patients with breast and/or ovarian cancer and their families. Analysis of 3,458 cases from Lower Silesia (Poland) according to the diagnostic algorithm of the National Cancer Control Programme. *Frontiers in genetics*, 13, 941375. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.941375>
 22. el Ansari, F. Z., Jouali, F., Marchoudi, N., Bennani, M. M., Ghailani, N. N., Barakat, A., & Fekkak, J. (2020). Screening of BRCA1/2 genes mutations and copy number variations in patients with high risk for hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC). *BMC Cancer*, 20(1), 747. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07250-0>
 23. Eldomery, M. K., Maciaszek, J. L., Cain, T., Loyola, V. P., Mothi, S. S., Wheeler, D. A., Tang, L., Wang, L., Klco, J. M., & Blackburn, P. R. (2024). Evaluation of Bayesian point-based system on the variant classification of hereditary cancer predisposition genes. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 26(12), 101276. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2024.101276>
 24. Fu, X., Tan, W., Song, Q., Pei, H., & Li, J. (2022). BRCA1 and Breast Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Front. Cell Dev. Biol.*, 10, 813457. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.813457>
 25. Gardovskis, A., Irmejs, A., Miklasevics, E., Borosenko, V., Bitina, M., Melbarde-Gorkusa, I., Vanags, A., Kurzawski, G., Suchy, J., Górski, B., & Gardovskis, J. (2005). Clinical, molecular and geographical features of hereditary breast/ovarian cancer in latvia. *Hereditary cancer in clinical practice*, 3(2), 71–76. <https://doi.org/10.1186/1897-4287-3-2-71>

26. Gabai-Kapara, E., Lahad, A., Kaufman, B., Friedman, E., Segev, S., Renbaum, P., Beeri, R., Gal, M., Grinshpun-Cohen, J., Djemal, K., Mandell, J. B., Lee, M. K., Beller, U., Catane, R., King, M.-C., & Levy-Lahad, E. (2014). Population-based screening for breast and ovarian cancer risk due to BRCA1 and BRCA2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *111*(39), 14205–14210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415979111>
27. Goidescu, I. G., Nemeti, G., Surcel, M., Caracostea, G., Florian, A. R., Cruciat, G., Staicu, A., Muresan, D., Goidescu, C., Pintican, R., & Eniu, D. T. (2023). Spectrum of High-Risk Mutations among Breast Cancer Patients Referred for Multigene Panel Testing in a Romanian Population. *Cancers*, *15*(6), 1895. <https://doi.org/10.3390/cancers15061895>
28. Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, *17*(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
29. Grabenstetter, A., Lazaro, C., & Turashvili, G. (2020). Editorial: Hereditary Breast and Ovarian Cancer: Current Concepts of Prevention and Treatment. *Front. Oncol.*, *10*, 618369. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.618369>
30. Grada, A., & Weinbrecht, K. (2013). Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *Journal of Investigative Dermatology*, *133*(8), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.248>
31. Guan, Y.-F., Li, G.-R., Wang, R.-J., Yi, Y.-T., Yang, L., Jiang, D., Zhang, X.-P., & Peng, Y. (2012). Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chin J Cancer*, *31*(10), 463–470. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10216>
32. Hakkaart, C., Pearson, J. F., Marquart, L., Dennis, J., Wiggins, G. A. R., Barnes, D. R., Robinson, B. A., Mace, P. D., Aittomäki, K., Andrulis, I. L., Arun, B. K., Azzollini, J., Balmaña, J., Barkardottir, R. B., Belhadj, S., Berger, L., Blok, M. J., Boonen, S. E., Borde, J., Bradbury, A. R., ... Walker, L. C. (2022). Copy number variants as modifiers of breast cancer risk for BRCA1/BRCA2 pathogenic variant carriers. *Communications biology*, *5*(1), 1061. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03978-6>
33. Hatano, Y., Tamada, M., Matsuo, M., & Hara, A. (2020). Molecular Trajectory of BRCA1 and BRCA2 Mutations. *Front. Oncol.*, *10*, 361. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00361>
34. Heramb, C., Wangensteen, T., Grindedal, E.M. et al. BRCA1 and BRCA2 mutation spectrum – an update on mutation distribution in a large cancer genetics clinic in Norway. *Hered Cancer Clin Pract* *16*, 3 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13053-017-0085-6>
35. International Human Genome Sequencing Consortium, Whitehead Institute for Biomedical Research Center for Genome Research; Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., ... Morgan, M. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
36. Ismail, T., Alzneika, S., Riguene, E., Al-maraghi, S., Alabdulrazzak, A., Al-Khal, N., Fetais, S., Thanassoulas, A., AlFarsi, H., & Nomikos, M. (2024). BRCA1 and Its Vulnerable C-Terminal BRCT Domain: Structure, Function, Genetic Mutations and Links to Diagnosis and Treatment of Breast and Ovarian Cancer. *Pharmaceuticals*, *17*(3), 333. <https://doi.org/10.3390/ph17030333>
37. Janavičius, R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA Journal* *1*, 397–412 (2010). <https://doi.org/10.1007/s13167-010-0037-y>
38. Janavičius, R., Rudaitis, V., Mickys, U., Elsakov, P., & Griškevičius, L. (2014). Comprehensive BRCA1 and BRCA2 mutational profile in Lithuania. *Cancer genetics*, *207*(5), 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2014.05.002>

39. Kerkhof, J., Schenkel, L. C., Reilly, J., McRobbie, S., Aref-Eshghi, E., Stuart, A., Rupa, C. A., Adams, P., Hegele, R. A., Lin, H., Rodenhiser, D., Knoll, J., Ainsworth, P. J., & Sadikovic, B. (2017). Clinical Validation of Copy Number Variant Detection from Targeted Next-Generation Sequencing Panels. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 19(6), 905–920. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.07.004>
40. King, M.-C., Levy-Lahad, E., & Lahad, A. (2014). Population-Based Screening for BRCA1 and BRCA2: 2014 Lasker Award. *JAMA*, 312(11), 1091. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.12483>
41. Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K.-A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M.-J., Jervis, S., van Leeuwen, F. E., Milne, R. L., Andrieu, N., Goldgar, D. E., Terry, M. B., Rookus, M. A., Easton, D. F., Antoniou, A. C., and the BRCA1, Consortium, B. C., McGuffog, L., Evans, D. G., ... Olsson, H. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, 317(23), 2402. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>
42. Kulski, J. K. (2016). Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. In J. K. Kulski (Ed.), *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61964>
43. Kwon, Y., Rösner, H., Zhao, W., Selemenakis, P., He, Z., Kawale, A. S., Katz, J. N., Rogers, C. M., Neal, F. E., Badamchi Shabestari, A., Petrosius, V., Singh, A. K., Joel, M. Z., Lu, L., Holloway, S. P., Burma, S., Mukherjee, B., Hromas, R., Mazin, A., ... Sung, P. (2023). DNA binding and RAD51 engagement by the BRCA2 C-terminus orchestrate DNA repair and replication fork preservation. *Nat Commun*, 14(1), 432. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36211-x>
44. Larson, N. B., Oberg, A. L., Adjei, A. A., & Wang, L. (2023). A Clinician’s Guide to Bioinformatics for Next-Generation Sequencing. *Journal of Thoracic Oncology*, 18(2), 143–157. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.11.006>
45. Le, H. P., Heyer, W.-D., & Liu, J. (2021). Guardians of the Genome: BRCA2 and Its Partners. *Genes*, 12(8), 1229. <https://doi.org/10.3390/genes12081229>
46. Leitsalu, L., Palover, M., Sikka, T.T. et al. Genotype-first approach to the detection of hereditary breast and ovarian cancer risk, and effects of risk disclosure to biobank participants. *Eur J Hum Genet* 29, 471–481 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41431-020-00760-2>
47. Loza, P., Irmejs, A., Daneberga, Z., Miklasevics, E., Berga-Svitina, E., Subatniece, S., Maksimenko, J., Trofimovics, G., Tauvena, E., Ukleikins, S., & Gardovskis, J. (2021). A novel frequent BRCA1 recurrent variant c.5117G > A (p.Gly1206Glu) identified after 20 years of BRCA1/2 research in the Baltic region: cohort study and literature review. *Hereditary cancer in clinical practice*, 19(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13053-021-00168-z>
48. Łukomska, A., Menkiszak, J., Gronwald, J., Tomiczek-Szwiec, J., Szwiec, M., Jasiówka, M., Blecharz, P., Kluz, T., Stawicka-Niełacna, M., Mądry, R., Białkowska, K., Prajzendanc, K., Kluźniak, W., Cybulski, C., Dębniak, T., Huzarski, T., Tołoczko-Grabarek, A., Byrski, T., Baszuk, P., ... Jakubowska, A. (2021). Recurrent Mutations in BRCA1, BRCA2, RAD51C, PALB2 and CHEK2 in Polish Patients with Ovarian Cancer. *Cancers*, 13(4), 849. <https://doi.org/10.3390/cancers13040849>
49. Marmolejo, D. H., Wong, M. Y. Z., Bajalica-Lagercrantz, S., Tischkowitz, M., Balmaña, J., Patócs, A. B., Chappuis, P., Colas, C., Genuardi, M., Haanpää, M., Vetti, H. H., Hoogerbrugge, N., Irmejs, A., Kahre, T., Klink, B., Krajc, M., Milagre, T. H., de Putter, R., Steinke-Lange, V., ... Wimmer, K. (2021). Overview of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) guidelines across Europe. *European Journal of Medical Genetics*, 64(12), 104350. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2021.104350>
50. Masson, E., Zou, W.-B., Génin, E., Cooper, D. N., le Gac, G., Fichou, Y., Pu, N., Rebours, V., Férec, C., Liao, Z., & Chen, J.-M. (2022). Expanding ACMG variant classification

- guidelines into a general framework. *Hum Genomics*, 16(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40246-022-00407-x>
51. McDevitt, T., Durkie, M., Arnold, N. et al. EMQN best practice guidelines for genetic testing in hereditary breast and ovarian cancer. *Eur J Hum Genet* 32, 479–488 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41431-023-01507-5>
 52. Mertes, F., ElSharawy, A., Sauer, S., van Helvoort, J. M. L. M., van der Zaag, P. J., Franke, A., Nilsson, M., Lehrach, H., & Brookes, A. J. (2011). Targeted enrichment of genomic DNA regions for next-generation sequencing. *Briefings in Functional Genomics*, 10(6), 374–386. <https://doi.org/10.1093/bfgp/blr033>
 53. Nelis, M., Esko, T., Mägi, R., Zimprich, F., Zimprich, A., Toncheva, D., et al. (2010) Correction: Genetic Structure of Europeans: A View from the North–East. *PLoS ONE* 5(3):10.1371/annotation/2849e182-aef5-4e2b-a5ac-0b74b30e5f48. <https://doi.org/10.1371/annotation/2849e182-aef5-4e2b-a5ac-0b74b30e5f48>
 54. Orr, K. S., & Savage, K. I. (2015). The BRCA1 and BRCA2 Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Genes — Implications for DNA Damage Response, DNA Repair and Cancer Therapy. In C. C. Chen (Ed.), *Advances in DNA Repair*. InTech. <https://doi.org/10.5772/59996>
 55. Parsons, M. T., de La Hoya, M., Richardson, M. E., Tudini, E., Anderson, M., Berkofsky-Fessler, W., Caputo, S. M., Chan, R. C., Cline, M. S., Feng, B.-J., Fortuno, C., Gomez-Garcia, E., Hadler, J., Hiraki, S., Holdren, M., Houdayer, C., Hruska, K., James, P., Karam, R., ... Spurdle, A. B. (2024). Evidence-based recommendations for gene-specific ACMG/AMP variant classification from the ClinGen ENIGMA BRCA1 and BRCA2 Variant Curation Expert Panel. *The American Journal of Human Genetics*, 111(9), 2044–2058. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2024.07.013>
 56. Pei, X. M., Yeung, M. H. Y., Wong, A. N. N., Tsang, H. F., Yu, A. C. S., Yim, A. K. Y., & Wong, S. C. C. (2023). Targeted Sequencing Approach and Its Clinical Applications for the Molecular Diagnosis of Human Diseases. *Cells*, 12(3), 493. <https://doi.org/10.3390/cells12030493>
 57. Peña-Guerrero, J., Fernández-Rubio, C., García-Sosa, A. T., & Nguewa, P. A. (2023). BRCT Domains: Structure, Functions, and Implications in Disease—New Therapeutic Targets for Innovative Drug Discovery against Infections. *Pharmaceutics*, 15(7), 1839. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071839>
 58. Petrucelli, N., Daly, M. B., & Feldman, G. L. (2010). Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genetics in Medicine*, 12(5), 245–259. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181d38f2f>
 59. Petrucelli, N., Daly, M.B., Pal, T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. 1998 Sep 4 [Updated 2025 Mar 20]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2025. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>
 60. Rebbeck, T. R., Friebel, T. M., Friedman, E., Hamann, U., Huo, D., Kwong, A., Olah, E., Olopade, O. I., Solano, A. R., Teo, S. H., Thomassen, M., Weitzel, J. N., Chan, T. L., Couch, F. J., Goldgar, D. E., Kruse, T. A., Palmero, E. I., Park, S. K., Torres, D., van Rensburg, E. J., ... Nathanson, K. L. (2018). Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with BRCA1 or BRCA2 mutations. *Human mutation*, 39(5), 593–620. <https://doi.org/10.1002/humu.23406>
 61. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics*

- in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
62. Roberts, E., van Veen, E. M., Byers, H., Barnett-Griness, O., Gronich, N., Lejbkowitz, F., Pinchev, M., Smith, M. J., Howell, A., Newman, W. G., Woodward, E. R., Harkness, E. F., Brentnall, A. R., Cuzick, J., Rennert, G., Howell, S. J., & Evans, D. G. (2023). Breast cancer polygenic risk scores derived in White European populations are not calibrated for women of Ashkenazi Jewish descent. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 25(9), 100846. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2023.100846>
 63. Rogoża-Janiszewska, E., Malińska, K., Cybulski, C., Jakubowska, A., Gronwald, J., Huzarski, T., Lener, M., Górski, B., Kluźniak, W., Rudnicka, H., Akbari, M. R., Kashyap, A., Narod, S. A., Lubiński, J., Dębniak, T., & on behalf of the Polish Hereditary Breast Cancer Consortium. (2020). Prevalence of Recurrent Mutations Predisposing to Breast Cancer in Early-Onset Breast Cancer Patients from Poland. *Cancers*, 12(8), 2321. <https://doi.org/10.3390/cancers12082321>
 64. Roy, R., Chun, J., & Powell, S. N. (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*, 12(1), 68–78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>
 65. Rudaitis, V., Zvirblis, T., Kanopiene, D., Janulynaitė, D., Griskevicius, L., & Janavicius, R. (2014). BRCA1/2 Mutation Status Is an Independent Factor of Improved Survival for Advanced (Stage III-IV) Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 24(8), 1395–1400. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000247>
 66. Sadzevičienė, I., Liaugaudienė, O., Besusparis, J., Asadauskienė, J., Kulikienė, I., Brasiūnienė, B., Sabaliauskaitė, R., & Jarmalaitė, S. (2020). Recurrent Germline BRCA2 Gene Mutation in Lithuanian Family. *Medicina*, 56(3), 119. <https://doi.org/10.3390/medicina56030119>
 67. Santonocito, C., Rizza, R., Paris, I., De Marchis, L., Paolillo, C., Tiberi, G., Scambia, G., & Capoluongo, E. (2020). Spectrum of Germline BRCA1 and BRCA2 Variants Identified in 2351 Ovarian and Breast Cancer Patients Referring to a Reference Cancer Hospital of Rome. *Cancers*, 12(5), 1286. <https://doi.org/10.3390/cancers12051286>
 68. Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, 12(7), 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>
 69. Savanevich, A., Ashuryk, O., Cybulski, C. et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in ovarian cancer patients from Belarus: update. *Hered Cancer Clin Pract* 19, 13 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13053-021-00169-y>
 70. Schmidt, A. Y., Hansen, T. v. O., Ahlborn, L. B., Jønson, L., Yde, C. W., & Nielsen, F. C. (2017). Next-Generation Sequencing–Based Detection of Germline Copy Number Variations in BRCA1 / BRCA2. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 19(6), 809–816. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.07.003>
 71. Shahid, T., Soroka, J., Kong, E. H., Malivert, L., McIlwraith, M. J., Pape, T., West, S. C., & Zhang, X. (2014). Structure and mechanism of action of the BRCA2 breast cancer tumor suppressor. *Nat Struct Mol Biol*, 21(11), 962–968. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2899>
 72. Singh, R. R. (2022). Target Enrichment Approaches for Next-Generation Sequencing Applications in Oncology. *Diagnostics*, 12(7), 1539. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12071539>
 73. SPKC. Latvijas veselības un veselības aprūpes rādītāju datubāze.
 74. Tamboom, K., Kaasik, K., Aršavskaja, J., Tekkel, M., Lilleorg, A., Padrik, P., Metspalu, A., & Veidebaum, T. (2010). BRCA1 mutations in women with familial or early-onset

- breast cancer and BRCA2 mutations in familial cancer in Estonia. *Hereditary cancer in clinical practice*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1897-4287-8-4>
75. Tea, Muy-Kheng M.; Kroiss, Regina; Muhr, Daniela; Fuerhauser-Rappaport, Christine; Oefner, Peter; Wagner, Teresa M.; Singer, Christian F. (2014). Central European BRCA2 mutation carriers: Birth cohort status correlates with onset of breast cancer. *Maturitas*, 77(1), 68–72. doi:10.1016/j.maturitas.2013.09.012
 76. Thompson, E., Goringe, K., Rowley, S. et al. Reevaluation of the BRCA2 truncating allele c.9976A > T (p.Lys3326Ter) in a familial breast cancer context. *Sci Rep* 5, 14800 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep14800>
 77. Thorslund, T., McIlwraith, M. J., Compton, S. A., Lekomtsev, S., Petronczki, M., Griffith, J. D., & West, S. C. (2010). The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 17(10), 1263–1265. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1905>
 78. Tihomirova, L., Vaivade, I., Fokina, O., Peculis, R., Mandrika, I., Sinicka, O., Stengrevics, A., Krilova, A., Keire, G., Petrevics, J., Eglitis, J., Timofejevs, M., & Leja, M. (2014). BRCA1 gene-related hereditary susceptibility to breast and ovarian cancer in Latvia. *Advances in medical sciences*, 59(1), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2013.09.002>
 79. Toss, A., Tomasello, C., Razzaboni, E., Contu, G., Grandi, G., Cagnacci, A., Schilder, R. J., & Cortesi, L. (2015). Hereditary Ovarian Cancer: Not Only BRCA 1 and 2 Genes. *BioMed Research International*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/341723>
 80. Vestergaard, L. K., Oliveira, D. N. P., Høgdall, C. K., & Høgdall, E. v. (2021). Next Generation Sequencing Technology in the Clinic and Its Challenges. *Cancers*, 13(8), 1751. <https://doi.org/10.3390/cancers13081751>
 81. Walker, L. C., Hoya, M., Wiggins, G. A. R., Lindy, A., Vincent, L. M., Parsons, M. T., Canson, D. M., Bis-Brewer, D., Cass, A., Tchourbanov, A., Zimmermann, H., Byrne, A. B., Pesaran, T., Karam, R., Harrison, S. M., Spurdle, A. B., & ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group (2023). Using the ACMG/AMP framework to capture evidence related to predicted and observed impact on splicing: Recommendations from the ClinGen SVI Splicing Subgroup. *American journal of human genetics*, 110(7), 1046–1067. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2023.06.002>
 82. Wallace, A. J. (2016). New challenges for BRCA testing: a view from the diagnostic laboratory. *Eur J Hum Genet*, 24(S1), S10–S18. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.94>
 83. Weitzel, J. N., Lagos, V. I., Cullinane, C. A., Gambol, P. J., Culver, J. O., Blazer, K. R., Palomares, M. R., Lowstuter, K. J., & MacDonald, D. J. (2007). Limited Family Structure and BRCA Gene Mutation Status in Single Cases of Breast Cancer. *JAMA*, 297(23), 2587. <https://doi.org/10.1001/jama.297.23.2587>
 84. Wojcik, P., Jasiowka, M., Strycharz, E. et al. Recurrent mutations of BRCA1, BRCA2 and PALB2 in the population of breast and ovarian cancer patients in Southern Poland. *Hered Cancer Clin Pract* 14, 5 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13053-016-0046-5>
 85. Wojtyła, C., Bertuccio, P., Giermaziak, W., Santucci, C., Odone, A., Ciebiera, M., Negri, E., Wojtyła, A., & la Vecchia, C. (2023). European trends in ovarian cancer mortality, 1990–2020 and predictions to 2025. *European Journal of Cancer*, 194, 113350. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2023.113350>
 86. Wooster, R., & Weber, B. L. (2003). Breast and Ovarian Cancer. *N Engl J Med*, 348(23), 2339–2347. <https://doi.org/10.1056/NEJMra012284>
 87. Xie, C., Luo, J., He, Y., Jiang, L., Zhong, L., & Shi, Y. (2022). BRCA2 gene mutation in cancer. *Medicine*, 101(45), e31705. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000031705>
 88. Yin, Y., Butler, C., & Zhang, Q. (2021). Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Human Immunology*, 82(11), 812–819. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.03.011>

89. Yoshida, R. (2021). Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast Cancer*, 28(6), 1167–1180. <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01148-2>
90. Zelli, V., Compagnoni, C., Cannita, K., Capelli, R., Capalbo, C., di Vito Nolfi, M., Alesse, E., Zazzeroni, F., & Tessitore, A. (2020). Applications of Next Generation Sequencing to the Analysis of Familial Breast/Ovarian Cancer. *High-Throughput*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.3390/ht9010001>

PIELIKUMI

Kritēriji patogēno variantu klasificēšanai. Adaptēts no [61].

Patogenitātes pierādījumi	Kritērija nosaukums	Rakturojums
Loti spēcīgs	PVS1	STOP kodonu veidojošs variants, rāmju nobīdes, kanoniskas ± 1 vai 2 sagriešanās vietas, iniciācijas kodona zaudējuma, viena eksona vai vairāku eksonu delēcijas variants gēnā, kur proteīna funkcijas zudums ir zināms slimības mehānisms.
Spēcīgs	PS1	Tāda pati aminoskābes izmaiņa kā iepriekš noteiktam patogēnajam variantam neatkarīgi no nukleotīdu izmaiņām.
	PS2	<i>De novo</i> (apstiprināta gan maternitātē, gan paternitātē) pacientam ar slimību un bez ģimenes anamnēzes.
	PS3	Labi pierādīti <i>in vitro</i> vai <i>in vivo</i> funkcionālie pētījumi, kas apstiprina kaitīgo ietekmi uz gēna vai gēna produkta.
	PS4	Varianta prevalence skartajos indivīdos ir ievērojami lielāka, salīdzinot ar prevalenci kontrolgrupās.
Vidēji spēcīgs	PM1	Atrodas mutāciju <i>hot spot</i> un/vai kritiskā un labi zināmā funkcionālā domēnā bez labdabīgām variācijām.
	PM2	Nav kontroles grupās (vai ir ļoti zems biežums, ja tās ir recesīvas) <i>gnomAD</i> .
	PM3	Recesīvām slimībām, kas konstatētas <i>in trans</i> ar patogēno variantu.
	PM4	Proteīna garuma izmaiņas, ko izraisa <i>in-frame</i> delēcijas/insercija neatkārtojamā reģionā vai <i>stop-loss</i> varianti.
	PM5	Jauna aminoskābes maiņa vietā, kur jau iepriekš ir novērota cita aminoskābes maiņa, kas noteikta kā patogēna.
	PM6	Pieņemts, ka <i>de novo</i> , bet bez paternitātes un maternitātes apstiprinājuma
Atbalstoši	PP1	Segregācija ar slimību vairākiem sirgstošiem ģimenes locekļiem gēnā, par kuru ir skaidri zināms, ka tas izraisa slimību.
	PP2	Aminoskābes maiņas variants gēnā, kurā ir zems labdabīgu aminoskābes maiņas variantu īpatsvars un kurā aminoskābes maiņas varianti ir biežs slimības mehānisms.
	PP3	Vairāki skaitliskie pierādījumi apstiprina kaitīgu ietekmi uz gēnu vai gēna produktu (konservācija, evolūcija, saplīšanas ietekme u. c.).
	PP4	Pacienta fenotips vai ģimenes anamnēze ir ļoti specifiska slimībai ar vienu ģenētisko etioloģiju.
	PP5	Atsaucīgs avots nesen ziņoja par variantu kā patogēnu, bet laboratorijai nav pieejami pierādījumi, lai veiktu neatkarīgu novērtējumu.

Labdabīgu variantu klasifikācijas kritēriji. Adaptēts no [61].

Patogenitātes pierādījumi	Kritērija nosaukums	Rakturojums
Neatkarīgi	BA1	Aleļu biežums ir virs 5 % Exome Sequencing Project, 1000 Genomes vai Exome Aggregation Consortium.
Spēcīgi	BS1	Aleļu biežums ir lielāks, nekā sagaidāms slimības gadījumā.
	BS2	Novērots veselam pieaugušam indivīdam recesīvā (homozigotiskā), dominējošā (heterozigotiskā) vai ar X saistītā (hemizigotiskā) traucējumā, ar paredzamu pilnīgu penetranci agrīnā vecumā.
	BS3	Labi pierādīti <i>in vitro</i> vai <i>in vivo</i> funkcionālie pētījumi neuzrāda kaitīgu ietekmi uz olbaltumvielu funkciju vai splaisingu .
	BS4	Segregācijas trūkums ģimenes locekļiem, kuri ir slimi.
Atbalstoši	BP1	Aminoskābes maiņas variants gēnā, par kuru galvenokārt ir zināms, ka tas izraisa slimības.
	BP2	Novērots in trans ar patogēnu variantu pilnībā penetranta dominējošam gēnam/ slimībai vai novērots in cis ar patogēnu variantu jebkurā iedzimtības veidā.
	BP3	Rāmja delēcijās/insercijās atkārtoto reģionos bez zināmas funkcijas.
	BP4	Vairāki skaitļošanas pierādījumi liecina, ka nav ietekmes uz gēnu vai gēnu produktu (konservācija, evolūcija, splaisingu ietekme u. c.).
	BP5	Variants, kas atrasts gadījumā ar alternatīvu slimības molekulāro pamatu.
	BP6	Atsaucīgs avots nesen ziņoja par variantu kā labdabīgu, bet laboratorijai nav pieejami pierādījumi, lai veiktu neatkarīgu novērtējumu.
	BP7	Sinonīms variants, kuram splaisinga prognozēšanas algoritmi neprognozē ietekmi uz splaisinga konsensa sekvenci vai jaunas splaisingu vietas izveidi, UN nukleotīds nav ļoti konservatīvs.

Noteikumi kritēriju kombinēšanai, klasificējot variantus. Adaptēts no [61].

Variantu klasifikācija	Kritēriju kombinācijas
Patogēns	i. 1 Ļoti spēcīgs (PVS1) UN a. ≥ 1 Spēcīgs (PS1-PS4) VAI b. ≥ 2 Vidēji spēcīgi (PM1-PM6) VAI c. 1 Vidēji spēcīgs (PM1-PM6) un 1 Atbalstošs (PP1-PP5) VAI d. ≥ 2 Atbalstoši (PP1-PP5) ii. ≥ 2 Spēcīgi (PS1-PS4) iii. 1 Spēcīgs (PS1-PS4) UN a. ≥ 3 Vidēji spēcīgi (PM1-PM6) VAI b. 2 Vidēji spēcīgi (PM1-PM6) un ≥ 2 Atbalstoši (PP1-PP5) VAI c. 1 Vidēji spēcīgs (PM1-PM6) un ≥ 4 Atbalstoši (PP1-PP5)
Ticami patogēns	i. 1 Ļoti spēcīgs (PVS1) un 1 Vidēji spēcīgs (PM1-PM6) ii. 1 Spēcīgs (PS1-PS4) un 1-2 Vidēji spēcīgi (PM1-PM6) iii. 1 Spēcīgs (PS1-PS4) un ≥ 2 Atbalstoši (PP1-PP5) iv. ≥ 3 Vidēji spēcīgi (PM1-PM6) v. 2 Vidēji spēcīgi (PM1-PM6) un ≥ 2 Atbalstoši (PP1-PP5) vi. 1 Vidēji spēcīgs (PM1-PM6) un ≥ 4 Atbalstoši (PP1-PP5)
Ticami labdabīgs	i. 1 Spēcīgs (BS1-BS4) un 1 Atbalstošs (BP1-BP7) ii. ≥ 2 Atbalstoši (BP1-BP7)
Labdabīgs	i. 1 Neatkarīgs (BA1) ii. ≥ 2 Spēcīgi (BS1-BS4)
VUS	i. Labdabīga un patogēna variantu kritēriji ir pretrunīgi. ii. Citi iepriekš minēti kritēriji nav izpildīti.

Identificētu variantu raksturojums

Rajons ^a	Lokalizācija ^b	Ref	Alēle	Genotips	n ^c	Interpretācija	ClinVar
32315655	5UTR(BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	104	Benign	VCV000209600.16
32315655	5UTR(BRCA2)	A	G	Homozigotisks	1	Benign	VCV000209600.16
32316435	5UTR(BRCA2)	G	A	Heterozigotisks	211	Benign	VCV000125965.53
32316435	5UTR(BRCA2)	G	A	Homozigotisks	27	Benign	VCV000125965.53
32319134	3ex(BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	7	Benign	VCV000037734.106
32332343	10ex(BRCA2)	A	C	Heterozigotisks	24	Benign	VCV000041567.90
32332592	10ex(BRCA2)	A	C	Heterozigotisks	191	Benign	VCV000009329.90
32332592	10ex(BRCA2)	A	C	Homozigotisks	22	Benign	VCV000009329.90
32332645	10ex(BRCA2)	G	A	Heterozigotisks	3	Likely benign	VCV000184355.49
32332843	10ex(BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	24	Benign	VCV000125943.87
32332992	10ex(BRCA2)	T	C	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000041542.81
32333296	10ex(BRCA2)	G	A	Heterozigotisks	1	Likely benign	VCV000183776.31
32334689	Intron 10-11 (BRCA2)	A	-	Heterozigotisks	4	Benign	
32334689	Intron 10-11 (BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	1	Benign	
32336584	11ex(BRCA2)	T	C	Heterozigotisks	22	Benign	VCV000125979.86
32336893	11ex(BRCA2)	A	C	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000051302.75
32337158	11ex(BRCA2)	G	C	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000037801.42
32337238	11ex(BRCA2)	G	A	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000051366.93
32337326	11ex(BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	23	Benign	VCV000041545.89
32337641	11ex(BRCA2)	G	T	Heterozigotisks	1	VUS	VCV000234133.13
32337751	11ex(BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	239	Benign	VCV000126010.84
32337751	11ex(BRCA2)	A	G	Homozigotisks	38	Benign	VCV000126010.84
32337870	11ex(BRCA2)	C	T	Heterozigotisks	5	Benign	VCV000041546.64
32337871	11ex(BRCA2)	G	A	Heterozigotisks	11	Benign	VCV000051481.105
32338162	11ex(BRCA2)	T	C	Heterozigotisks	140	Likely benign	VCV000126023.3
32338162	11ex(BRCA2)	T	C	Homozigotisks	10	Likely benign	VCV000126023.3
32338423	11ex(BRCA2)	G	A	Heterozigotisks	8	Benign	VCV000051589.112
32338613	11ex(BRCA2)	G	T	Heterozigotisks	7	Benign	VCV000041549.108
32338669	11ex(BRCA2)	C	T	Heterozigotisks	1	Likely benign	VCV000182286.47
32339053	11ex(BRCA2)	C	T	Heterozigotisks	1	Likely benign	VCV000186633.26
32339425	11ex(BRCA2)	A	C	Heterozigotisks	2	Benign	VCV000037942.61
32339554	11ex(BRCA2)	C	T	Heterozigotisks	45	Benign	VCV000051813.92
32339810	11ex(BRCA2)	C	T	Heterozigotisks	3	Benign	VCV000051865.57
32340099	11ex(BRCA2)	C	T	Heterozigotisks	47	Benign	VCV000041556.91
32340099	11ex(BRCA2)	C	T	Homozigotisks	2	Benign	VCV000041556.91
32340140	11ex(BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000037997.54
32340455	11ex(BRCA2)	C	T	Heterozigotisks	6	Benign	VCV000041558.117
32341176	11ex(BRCA2)	G	T	Heterozigotisks	1	Likely benign	VCV000052199.66
32355095	14ex(BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	179	Benign	VCV000126133.84
32355095	14ex(BRCA2)	A	G	Homozigotisks	9	Benign	VCV000126133.84
32357785	16ex(BRCA2)	G	A	Heterozigotisks	1	VUS	VCV000091489.44
32363351	18ex(BRCA2)	G	T	Heterozigotisks	3	Benign	VCV000041564.90
32363358	18ex(BRCA2)	T	C	Heterozigotisks	1	VUS	VCV000834531.8

Identificētu variantu raksturojums

Genomiskais rajons ^a	Lokalizācija ^b	Ref	Alēle	Genotips	n ^c	Interpretācija	ClinVar
32371040	20ex(BRCA2)	C	T	Heterozigotisks	1	Pathogenic	VCV000052624.19
32379834	23ex(BRCA2)	C	T	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000038205.71
32380149	Intron 24-25 (BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	1	VUS	VCV000566278.8
32398489	27ex(BRCA2)	A	T	Heterozigotisks	3	Benign	VCV000038266.120
32398608	27ex(BRCA2)	C	GAATTATATCT	Heterozigotisks	8	Likely benign	VCV000125926.55
32398623	27ex(BRCA2)	G	A	Heterozigotisks	6	Benign	VCV000051043.101
32398875	3UTR(BRCA2)	A	C	Heterozigotisks	138	Benign	VCV000125927.22
32398875	3UTR(BRCA2)	A	C	Homozigotisks	13	Benign	VCV000125927.22
32399139	3UTR(BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	249	Benign	VCV000209924.8
32399139	3UTR(BRCA2)	A	G	Homozigotisks	34	Benign	VCV000209924.8
32399143	3UTR(BRCA2)	A	-	Heterozigotisks	235	Benign	VCV000209925.1
32399302	3UTR(BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	157	Benign	VCV000209928.7
32399302	3UTR(BRCA2)	A	G	Homozigotisks	8	Benign	VCV000209928.7
32399600	3UTR(BRCA2)	T	-	Heterozigotisks	308	Likely benign	
32399600	3UTR(BRCA2)	T	-	Homozigotisks	10	Likely benign	
32399609	3UTR(BRCA2)	T	C	Heterozigotisks	6	Likely benign	VCV000311676.30
32399611	3UTR(BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	2	Benign	VCV000264893.6
32399705	3UTR(BRCA2)	C	-	Heterozigotisks	1	Likely benign	
32399747	3UTR(BRCA2)	A	G	Heterozigotisks	2	Likely benign	
32399787	3UTR(BRCA2)	T	-	Heterozigotisks	17	Likely benign	
32399789	3UTR(BRCA2)	T	-	Heterozigotisks	1	Benign	
32399885	3UTR(BRCA2)	C	A	Homozigotisks	514	Benign	
32399934	3UTR(BRCA2)	C	T	Heterozigotisks	8	Benign	
32400081	3UTR(BRCA2)	C	T	Heterozigotisks	8	Benign	
32400151	3UTR(BRCA2)	T	A	Heterozigotisks	190	Benign	
32400151	3UTR(BRCA2)	T	A	Homozigotisks	233	Benign	
43044346	3UTR(BRCA1)	C	T	Heterozigotisks	8	Benign	VCV000209232.10
43044386	3UTR(BRCA1)	A	G	Heterozigotisks	1	VUS	VCV000323409.6
43044391	3UTR(BRCA1)	G	A	Heterozigotisks	231	Likely benign	VCV000371821.12
43044391	3UTR(BRCA1)	G	A	Homozigotisks	39	Likely benign	VCV000371821.12
43044592	3UTR(BRCA1)	T	G	Heterozigotisks	1	VUS	
43044805	3UTR(BRCA1)	T	-	Heterozigotisks	16	Benign	VCV000264856.7
43045257	3UTR(BRCA1)	C	A	Heterozigotisks	233	Benign	VCV000209234.14
43045257	3UTR(BRCA1)	C	A	Homozigotisks	37	Benign	VCV000209234.14
43045473	3UTR(BRCA1)	A	C	Heterozigotisks	1	Benign	
43046758	Intron 22-23 (BRCA1)	A	-	Heterozigotisks	185	Likely benign	
43063909	17ex(BRCA1)	C	T	Heterozigotisks	1	Pathogenic	VCV000037638.31
43067677	16ex(BRCA1)	C	A	Heterozigotisks	4	Likely benign	VCV000041831.49
43067699	Intron 15-16 (BRCA1)	A	C	Heterozigotisks	1	Likely benign	VCV000489726.17
43070958	15ex(BRCA1)	C	T	Heterozigotisks	43	Benign	VCV000041830.108
43070958	15ex(BRCA1)	C	T	Homozigotisks	1	Benign	VCV000041830.108
43071077	15ex(BRCA1)	T	C	Heterozigotisks	250	Benign	VCV000041827.89

Identificētu variantu raksturojums

Genomiskais rajons ^a	Lokalizācija ^b	Ref	Alēle	Genotips	n ^c	Interpretācija	ClinVar
43071077	15ex(BRCA1)	T	C	Homozigotisks	39	Benign	VCV000041827.89
43071102	15ex(BRCA1)	T	C	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000055293.87
43074331	14ex(BRCA1)	C	T	Heterozigotisks	1	Pathogenic	VCV000037605.27
43079339	Intron 12-13 (BRCA1)	A	G	Heterozigotisks	1	Likely benign	VCV000523689.4
43082453	12ex(BRCA1)	A	G	Heterozigotisks	234	Benign	VCV000125703.85
43082453	12ex(BRCA1)	A	G	Homozigotisks	41	Benign	VCV000125703.85
43091492	10ex(BRCA1)	T	C	Heterozigotisks	2	Benign	VCV000041821.114
43091496	10ex(BRCA1)	T	-	Heterozigotisks	1	Pathogenic	VCV000037560.91
43091783	10ex(BRCA1)	C	T	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000054987.66
43091983	10ex(BRCA1)	T	C	Heterozigotisks	245	Benign	VCV000041818.88
43091983	10ex(BRCA1)	T	C	Homozigotisks	37	Benign	VCV000041818.88
43092412	10ex(BRCA1)	C	T	Heterozigotisks	6	Benign	VCV000017670.109
43092418	10ex(BRCA1)	T	C	Heterozigotisks	240	Benign	VCV000041815.88
43092418	10ex(BRCA1)	T	C	Homozigotisks	41	Benign	VCV000041815.88
43092504	10ex(BRCA1)	T	G	Heterozigotisks	2	Likely benign	VCV000462600.10
43092919	10ex(BRCA1)	G	A	Heterozigotisks	251	Benign	VCV000041812.90
43092919	10ex(BRCA1)	G	A	Homozigotisks	37	Benign	VCV000041812.90
43093054	10ex(BRCA1)	G	T	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000037473.73
43093220	10ex(BRCA1)	A	G	Heterozigotisks	249	Benign	VCV000125554.84
43093220	10ex(BRCA1)	A	G	Homozigotisks	38	Benign	VCV000125554.84
43093257	10ex(BRCA1)	C	T	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000234057.8
43093449	10ex(BRCA1)	G	A	Heterozigotisks	241	Benign	VCV000125536.85
43093449	10ex(BRCA1)	G	A	Homozigotisks	41	Benign	VCV000125536.85
43093454	10ex(BRCA1)	C	T	Heterozigotisks	29	Benign	VCV000041808.87
43094160	10ex(BRCA1)	T	-	Heterozigotisks	1	Pathogenic	VCV000054223.7
43094464	10ex(BRCA1)	T	C	Heterozigotisks	50	Benign	VCV000041803.93
43094464	10ex(BRCA1)	T	C	Homozigotisks	3	Benign	VCV000041803.93
43097246	8ex(BRCA1)	G	A	Heterozigotisks	4	Benign	VCV000055642.113
43099814	7ex(BRCA1)	G	A	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000055393.30
43104861	Intron 5-6 (BRCA1)	C	T	Heterozigotisks	1	Benign	VCV000037499.60
43125337	5UTR(BRCA1)	G	A	Heterozigotisks	1	Likely benign	VCV000323423.45
32318104..32318106	Intron 2-3 (BRCA2)	AGT	-	Heterozigotisks	18	Benign	VCV000209612.1
32329468..32329469	8ex(BRCA2)	TG	-	Heterozigotisks	1	Pathogenic	VCV000009342.95
32334687..32334689	Intron 10-11 (BRCA2)	AGA	G	Heterozigotisks	2	VUS	
32334689..32334690	Intron 10-11 (BRCA2)	AA	-	Heterozigotisks	1	Benign	
32399599^32399600	3UTR(BRCA2)	-	T	Heterozigotisks	1	Benign	
32399786^32399787	3UTR(BRCA2)	-	T	Heterozigotisks	5	Benign	
32399787..32399788	3UTR(BRCA2)	TT	-	Heterozigotisks	13	Benign	

Identificētu variantu raksturojums

Genomiskais rajons ^a	Lokalizācija ^b	Ref	Alēle	Genotips	n ^c	Interpretācija	ClinVar
32399787..32399789	3UTR(BRCA2)	TTT	-	Heterozigotisks	22	Benign	
32399787..32399790	3UTR(BRCA2)	TTTT	-	Heterozigotisks	1	Benign	
43044805..43044806	3UTR(BRCA1)	TT	-	Heterozigotisks	40	Benign	
43044805..43044807	3UTR(BRCA1)	TTT	-	Heterozigotisks	61	Benign	
43044805..43044808	3UTR(BRCA1)	TTTT	-	Heterozigotisks	14	Benign	
43044805..43044809	3UTR(BRCA1)	TTTTT	-	Heterozigotisks	2	Benign	
43044805..43044810	3UTR(BRCA1)	TTTTTT	-	Heterozigotisks	1	Benign	
43044805..43044811	3UTR(BRCA1)	TTTTTTT	-	Heterozigotisks	3	Benign	
43046758..43046759	Intron 22-23 (BRCA1)	AA	-	Heterozigotisks	131	Likely benign	
43046758..43046759	Intron 22-23 (BRCA1)	AA	-	Homozigotisks	1	Likely benign	
43046758..43046760	Intron 22-23 (BRCA1)	AAA	-	Heterozigotisks	8	Likely benign	
43057062^43057063	19ex(BRCA1)	-	G	Heterozigotisks	1	Pathogenic	VCV000017677.139
43058378..43058381	Intron 18-19 (BRCA1)	AAAC	-	Heterozigotisks	1	Benign	
43058379..43058381	Intron 18-19 (BRCA1)	AAC	-	Heterozigotisks	1	Benign	
43058380..43058381	Intron 18-19 (BRCA1)	AC	-	Heterozigotisks	4	Benign	
43096572..43096573	Intron 8-9 (BRCA1)	AA	-	Heterozigotisks	146	Benign	
43096572..43096574	Intron 8-9 (BRCA1)	AAA	-	Heterozigotisks	103	Benign	
43096572..43096574	Intron 8-9 (BRCA1)	AAA	-	Homozigotisks	1	Benign	
43096572..43096575	Intron 8-9 (BRCA1)	AAAA	-	Heterozigotisks	4	Benign	
43096572..43096575	Intron 8-9 (BRCA1)	AAAA	-	Homozigotisks	1	Benign	
43096572..43096576	Intron 8-9 (BRCA1)	AAAAA	-	Heterozigotisks	2	Benign	
43096572..43096576	Intron 8-9 (BRCA1)	AAAAA	-	Homozigotisks	1	Benign	
43100555..43100562	Intron 6-7 (BRCA1)	TGTGTATA	-	Heterozigotisks	1	Likely benign	
43100557..43100562	Intron 6-7 (BRCA1)	TGTATA	-	Heterozigotisks	1	Likely benign	

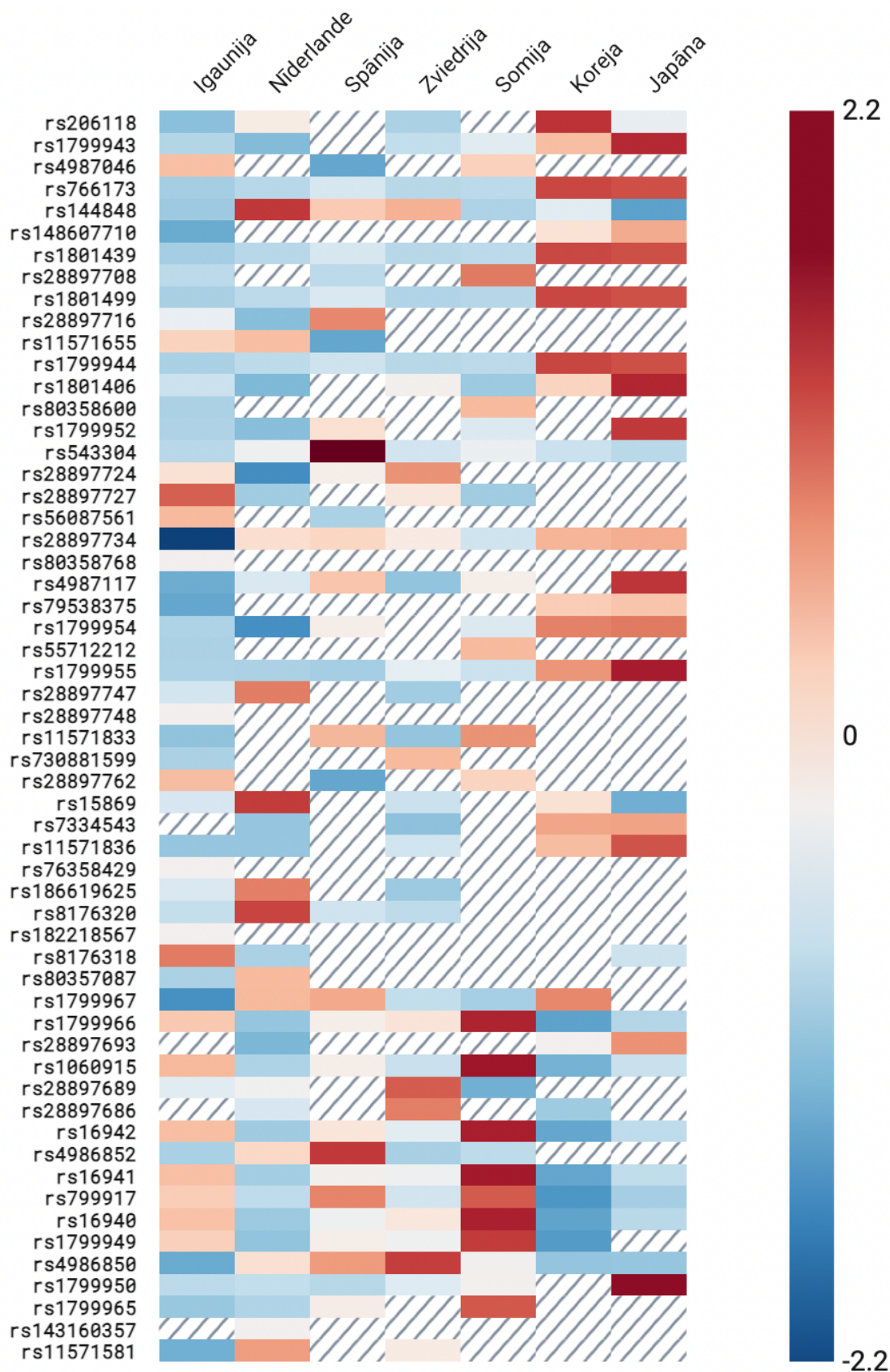
^a GRCh38 reference genomes^b NM_007294.4(BRCA1); BRCA2 NM_000059.4(BRCA2)^c Identificētu individu skaits

Variantu biežums

dbSNP (rs)	Latvija	Igaunija	Koreja	Somija	Nīderlande	Zviedrija	Japāna	Spānija
rs206118	0,0985	0,1286	0,1831		0,151	0,133	0,1447	
rs1799943	0,2463	0,2719	0,3803	0,188	0,246	0,282	0,464	
rs4987046	0,0065	0,0027		0,003				0,006
rs766173	0,0223	0,0232	0,1341	0,013	0,030	0,015	0,1312	0,043
rs144848	0,2184	0,2366	0,255	0,24	0,315	0,288	0,2136	0,281
rs148607710	0,0028	0,0011	0,0003				0,00001	
rs1801439	0,0223	0,0232	0,1337	0,013	0,03	0,015	0,1312	0,043
rs28897708	0,0009	0,002		0,003				0,002
rs1801499	0,0204	0,023	0,1344	0,013	0,03	0,015	0,1312	0,043
rs28897716	0,0009	0,0004			0,001			0,002
rs11571655	0,0009	0,0029			0,003			0,002
rs1799944	0,0214	0,0232	0,1341	0,013	0,03	0,015	0,131	0,037
rs1801406	0,2928	0,3348	0,3951	0,312	0,3	0,367	0,4788	
rs80358600	0,0046	0,0065		0,007				
rs1799952	0,0102	0,0036		0,003	0,004		0,00001	0,002
rs543304	0,1487	0,1607	0,1672	0,184	0,185	0,127	0,1361	0,009
rs28897724	0,0074	0,0033			0,007	0,013		0,011
rs28897727	0,0065	0,0154		0,007	0,006	0,002		
rs56087561	0,0019	0,0002						0,002
rs28897734	0,0418	0,0306	0,0007	0,013	0,005	0,007	0,00019	0,004
rs80358768	0,0028	0,0011						
rs4987117	0,0474	0,035		0,02	0,025	0,032	0,00008	0,013
rs79538375	0,0009	0,0002	0,0088				0,00917	
rs1799954	0,0056	0,0038	0,0001	0,003	0,006		0,00001	0,009
rs55712212	0,0009	0,0036		0,01				
rs1799955	0,1831	0,2258	0,3928	0,25	0,225	0,277	0,4759	0,221
rs28897747	0,0028	0,0038			0,001	0,002		
rs28897748	0,0009	0,0002						
rs11571833	0,0028	0,0029		0,01		0,003		0,009
rs730881599	0,0074	0,0033				0,002		
rs28897762	0,0056	0,0027		0,003				0,006
rs15869	0,1524	0,1775	0,191		0,217	0,175	0,1621	
rs7334543	0,2946		0,0394		0,276	0,283	0,03725	
rs11571836	0,1608	0,225	0,3924		0,225	0,273	0,47166	
rs76358429	0,0056	0,0038						
rs186619625	0,0019	0,0016			0,001	0,002		
rs8176320	0,0074	0,0065			0,019	0,008		0,006
rs182218567	0,0009	0,0009						
rs8176318	0,2853	0,3569			0,322		0,3269	
rs80357087	0,0037	0,0036			0,001			
rs1799967	0,0418	0,0424	0,0001	0,053	0,006	0,027		0,004
rs1799966	0,3048	0,3569	0,3145	0,385	0,323	0,26	0,3277	0,345
rs28897693	0,0009		0,0012		0,001		0,00041	

Variantu biežums

dbSNP (rs)	Latvija	Igaunija	Koreja	Somija	Nīderlande	Zviedrija	Japāna	Spānija
rs1060915	0,2937	0,3565	0,313	0,385	0,322	0,26	0,3274	0,341
rs28897689	0,0019	0,0054		0,003	0,006	0,01		
rs28897686	0,0009		0,0001		0,002	0,003		
rs16942	0,2965	0,3558	0,3133	0,382	0,322	0,258	0,32711	0,346
rs4986852	0,0056	0,0083		0,01	0,021	0,003		0,034
rs16941	0,2993	0,3563	0,3121	0,385	0,322	0,26	0,327	0,341
rs799917	0,3020	0,3605	0,3122	0,382	0,332	0,268	0,32699	0,375
rs16940	0,3020	0,3556	0,3132	0,382	0,322	0,258	0,3267	0,339
rs1799949	0,3002	0,3558	0,3124	0,382	0,322	0,258		0,346
rs4986850	0,0270	0,0489	0,0003	0,069	0,075	0,097	0,00001	0,086
rs1799950	0,0520	0,0754		0,082	0,076	0,025	0,00001	0,075
rs1799965	0,0037	0,0042		0,007	0,003			0,002
rs143160357	0,0009				0,002			
rs11571581	0,0167	0,0254			0,041	0,035		



Variantu biežuma līdzība ar Latviju. Krāsu skala norāda atšķirību lielumu, kur sarkani toņi norāda uz lielākām novirzēm un zilie toņi uz mazākām novirzēm.