

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

**Analýza nádorové predispozice a funkční analýza variant
nejasného významu**

Analysis of cancer predisposition and functional analysis of variants of unknown
significance

Mgr. Lenka Stolařová

2021

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. lékařská fakulta

Školitel: prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Libor Macůrek, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Abstrakt

Průměrně 5-10% všech onkologických onemocnění vzniká u pacientů s dědičnými nádory, kteří mohou mít mutace v desítkách až stovkách nádorových predispozičních genů. Fenotypy se u nosičů mutací překrývají, proto je paralelní vyšetření panelů genů metodou volby v diagnostice. V naší laboratoři jsme připravili univerzální panel i panel určený k cílené analýze specifického nádorového onemocnění, které nám umožnily identifikovat genetické alterace u pacientek s karcinomem prsu a ovaria, pacientů s melanomem, a dalšími nádorovými onemocněními v ČR. Výsledky analýz sekvenování nové generace (NGS) ukazují, že nejčastější genetickou příčinou v ČR u karcinomu ovaria jsou dědičné mutace v *BRCA1* (u 24% neselektovaných pacientek) a u maligního melanomu *CDKN2A* (u 2 % rizikových pacientů). Přítomnost dědičných alterací je klinicky významným fenoménem ovlivňujícím prognózu i léčbu onemocnění. Interpretaci nálezů NGS však komplikuje přítomnost variant nejasného významu (VUS). Na interpretaci VUS v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* se podílíme v rámci mezinárodního konsorcia ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles). Naše i mezinárodní výsledky nejvíce studované skupiny dědičných nádorových onemocnění – pacientek s karcinomem prsu a ovaria ukazují, že třetím nejčastěji mutovaným genem v této skupině je *CHEK2*, jehož dědičné mutace predisponují i ke vzniku dalších nádorových onemocnění. Pro jeho analýzu jsme připravili modelový systém založený na cílené delecii endogenního genu *CHEK2* pomocí CRISPR/Cas9 v lidských nenádorových buňkách RPE1 a následné expresi fluorescenčně značené varianty CHK2. Pomocí tohoto systému jsme funkčně klasifikovali VUS nalezené u pacientek s karcinomem ovaria a vysoce rizikových nemocných s melanomem. Tímto přístupem nyní analyzujeme i varianty *CHEK2* identifikované v rámci ENIGMA konsorcia. Funkční klasifikace variant *CHEK2* významně přispěla k rozlišení benigních a patogenních variant vyskytujících se v české populaci.

Klíčová slova: NGS, CZECAANCA, panelové sekvenování, nádorová predispozice, funkční analýza, *CHEK2*, kináza CHK2

Abstract

On average, 5-10% of all cancers occur in patients with hereditary tumors, who may have mutations in tens to hundreds of tumor predisposition genes. The phenotypes in mutation carriers overlap, and parallel analyses with sequencing panels is the method of choice in diagnostics. In our laboratory, we designed a universal panel and a targeted panel for a specific cancer, which allowed us to identify genetic alterations in patients with ovarian cancer, breast cancer, melanoma, and other cancers in the Czech Republic. The results of next generation sequencing (NGS) analyses show that the most frequent genetic alteration in ovarian cancers patients in the Czech Republic are hereditary mutations in *BRCA1* (in 24% of unselected patients) and in malignant melanoma patients *CDKN2A* (in 2% of high risk patients). The presence of hereditary alterations is a clinically significant phenomenon affecting the prognosis and treatment of the disease. However, the interpretation of NGS findings is complicated by the presence of variants of unknown significance (VUS). We participate in the interpretation of VUS in the main predisposing genes *BRCA1* and *BRCA2* within the international consortium ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles). Our and international results of the most studied group of hereditary cancers – breast and ovarian cancers – identified *CHEK2* as the third most mutated gene, which germline mutations predispose to the development of various cancer types. For its analysis, we prepared a model system based on the targeted deletion of the endogenous *CHEK2* gene using CRISPR/Cas9 in human non-transformed RPE1 cells and the subsequent expression of the fluorescently labeled CHK2 variant. Using this system, we functionally classified VUS found in patients with ovarian cancer and high-risk patients with melanoma. With this approach, we are now analyzing the *CHEK2* variants identified within the ENIGMA consortium. The functional classification of *CHEK2* variants significantly contributed to the classification of benign and pathogenic variants occurring in the Czech population.

Key words: NGS, CZECANCA, panel sequencing, cancer predisposition, functional analysis, *CHEK2*, CHK2 kinase

1 Výhodiska a cíle práce

Naše pracoviště, Laboratoř onkogenetiky se zabývá studiem hereditárních nádorů od svého založení. Za více než 20 let byla analyzována DNA od několika tisíc pacientů s nejrůznějšími dědičnými malignitami. S nástupem sekvenování nové generace (NGS), jsme se rozhodli vytvořit sekvenační panel CZE CANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application a jeho validace a optimalizace mi umožnila proniknout do přípravy sekvenačních knihoven (Soukupova, Zemankova et al. 2018).

Výsledky našich analýz ukázaly, že mezi nejčastěji se vyskytující dědičné varianty patří alterace genu *CHEK2* kódující kinázu CHK2. Většina nacházených germinálních missense variant však nemá jasné klinické vysvětlení. Funkci kinázy a analýzám vybraných variant genu jsem se věnovala v bakalářské a později diplomové práci. Tyto analýzy hodnotily funkční katalytickou aktivity CHK2 kinázy *in vitro*, avšak pro hodnocení významu dědičných mutací bylo nezbytné připravit vhodnější experimentální model v živých lidských nenádorových buňkách.

Cíle práce:

- 1) **identifikace genetických alterací v genu *CHEK2* u pacientek s nádorovým onemocněním pomocí NGS analýzy**
- 2) **vytvoření modelového systému pro hodnocení nalezených sekvenčních variant nejasného významu v genu *CHEK2* a funkční klasifikace těchto variant**

2 Úvod

2.1 Hereditární nádorová onemocnění

Přibližně 90-95 % případů nádorových onemocnění vzniká na základě akumulace genetických změn získaných v průběhu života jedince, tzv. somatické mutace a jedná se tak o sporadický výskyt nádorového onemocnění. Podstatně menší procentuální zastoupení, zbývajících 5-10 %, mají hereditární nádorová onemocnění, pro která je hlavním faktorem vzniku vrozená predispozice.

V disertační práci se dominantně věnuji analýzám nádorové predispozice u pacientek s karcinomem prsu a ovaria a u nemocných s maligním melanomem. **Karcinom prsu** je nejčastějším nádorovým onemocněním v populaci žen v ČR. Hlavními predispozičními geny pro vznik karcinomu prsu v ČR je *BRCA1* a s odstupem *BRCA2* (Pohlreich, Zikan et al. 2005, Ticha, Kleibl et al. 2010). Třetím nejčastěji mutovaným genem u pacientek s dědičným karcinomem prsu je gen *CHEK2*.

S karcinomem prsu bývá často asociován **karcinom ovaria**, který je nejsmrtelnější gynekologickou diagnózou. Podobně jako je tomu u karcinomu prsu, jsou nejčastěji mutovanými geny u hereditární formy geny *BRCA1* a *BRCA2*. Naše předchozí analýzy genů predisponujících ke vzniku karcinomu ovaria ukázaly, že na jeho vzniku se u pacientů v ČR podílejí rovněž ostatní predispoziční geny (Janatova, Soukupova et al. 2015).

Za hlavní predispoziční gen pro vznik **maligního melanomu** je považován *CDKN2A*, kódující alternativní transkripty, které dávají vzniknout tumor supresorovým proteinům rodiny P16/INK4a (inhibitors of CDK4) a P14/ARF (alternate reading frame) (Sharpless 2005). Zvýšené riziko vzniku melanomu bylo popsáno i v souvislosti s nosičstvím mutací v genech asociujících s dalšími nádory (např. *BRCA2*, *CHEK2*). Výskyt nádorové predispozice k melanomu v ČR nebyl doposud studován.

2.2 Nádorové predispoziční geny a jejich germinální varianty

Zárodečné mutace v klinicky nejvíce významných genech – hlavních predispozičních genech pro dané onemocnění s vysokou penetrancí, představují pro nosiče významně zvýšené riziko vzniku onemocnění. Až na naprosté výjimky, penetrance onemocnění není u hereditárních nádorových syndromů úplná. V populaci jsou nejvíce zastoupeny klinicky málo významné mutace v nízko penetrantních genech. Se zvyšující se penetrancí (klinicky rizikem vzniku tumoru) se frekvence germinálních mutací snižuje (Foulkes 2008).

Na rozdíl od vysoce penetrantních genů *BRCA1* a *BRCA2*, jejichž roli pro vznik nádorového onemocnění nikdo nezpochybnuje, je interpretace nálezů v genu *CHEK2* se střední penetrancí stále v mnoha případech opomíjena. Jedním z důvodů je značně kolísavá prevalence populačně specifických germinálních variant tohoto genu ve světě a jejich nejasná penetrance. Dalším důvodem je i vysoký počet variant nejasného významu (VUS), pro které chybí jednotná klinická či funkční interpretace. Rozhodli jsme se proto zmapovat prevalenci mutací v *CHEK2* a jejich asociaci s nádorovými syndromy, ale především jsme se zaměřili na vytvoření modelového systému pro analýzu jeho vzácných, populačně specifických variant nejasného významu a klasifikaci těchto variant.

2.3 Gen *CHEK2* a kináza *CHK2*

CHK2 kináza byla první popsána Matsuokou et al. v roce 1998 (Matsuoka, Huang et al. 1998). Byla zasazena do signální dráhy v odpovědi na dvouřetězcová poškození DNA v rámci osy ATM-*CHK2*-p53 (Brown, Lee et al. 1999, Chaturvedi, Eng et al. 1999, Hirao, Kong et al. 2000, Matsuoka, Rotman et al. 2000). Spojení dědičných mutací v genu *CHEK2* s nádorovými syndromy bylo poprvé popsáno v roce 1999 Bellovou a kolektivem, kteří u skupiny pacientů (především s karcinomem prsu) s Li-Fraumeni syndromem, resp. Li-Fraumeni-like syndromem, nesoucích wild-type alely kauzálního genu *TP53*, identifikovali variantu c.1100delC *CHEK2* a p.I157T (Bell, Varley et al. 1999).

2.3.1 Struktura *CHK2*

Gen *CHEK2* se nachází na chromozomu 22 (22q12.1) a jeho nejvíce exprimovaná varianta 1 (NM_007194/ENST00000404276.6) kóduje mRNA obsahující 15 exonů (Tominaga, Morisaki et al. 1999).

Proteinový produkt nejčastější sestřihové varianty má 543 aminokyselin a velikost 65 kDa. CHK2 ve své struktuře obsahuje tři funkční domény – SQ/TQ cluster domain (SCD), forkhead-associated domain (FHA) a kinázovou doménu (Ahn, Urist et al. 2004). N-koncová SCD doména (aminokyselinové zbytky 16 -69) je bohatá na kombinaci párů serin/glutamin a threonin/glutamin, jež jsou cílem fosforylace nadřazených kináz, nejdůležitějším a nejvíce studovaným je Thr68, který je především cílem aktivační kinázy ATM (Matsuoka, Rotman et al. 2000, Ouchi and Ouchi 2014). Následná FHA doména (aminokyseliny 92 – 205) je důležitým protein-fosfoproteinovým modulem (Li, Williams et al. 2002), jenž se podílí na vazbě substrátů a interakčních partnerů. Je však důležitá i pro aktivaci samotné kinázy CHK2, kdy je schopna vázat pThr68 v oblasti SCD domény druhého monomeru. Kinázová doména se serin/threoninovou specifitou zaujímá velkou část C-koncové sekvence CHK2 (aminokyselinové zbytky 212 – 501).

2.3.2 Regulace aktivity CHK2

V normálním stavu se CHK2 v buňce vyskytuje v podobě neaktivního protomeru. V reakci na dvouřetězcová poškození DNA kináza ATM fosforyluje CHK2 na Thr68, což umožňuje jeho rozpoznání a navázání FHA doménou druhé molekuly CHK2 a dochází k transienční dimerizaci a *trans*-autofosforylovací zbytků Thr383 a Thr387 v aktivační smyčce proteinu. Autofosforylací dochází ke konformační změně, která vede k rozpadu dimeru a uvolnění dvou plně aktivních monomerů CHK2 kinázy (Li, Williams et al. 2002, Wybenga-Groot, Ho et al. 2014). Cílem aktivační fosforylace je také Ser516, jenž je autofosforylován a je ukazatelem plné katalytické aktivity CHK2 (Schwarz, Lovly et al. 2003, Wu and Chen 2003). Aktivace katalytické funkce kinázy může nastat i při absenci dvouřetězcových zlomů DNA a fosforylace ATM a to v důsledku ektopické nadprodukce proteinu v bakteriálních či savčích buňkách (Schwarz, Lovly et al. 2003, Kleiblova, Stolarova et al. 2019).

Proteinem, který defosforyluje CHK2 je WIP1 (Oliva-Trastoy, Berthonaud et al. 2007). Fosfatáza WIP1 je schopna defosforylovat Thr68, avšak nedokáže defosforylovat threoninové zbytky v aktivační kličce (Fujimoto, Onishi et al. 2006, Yoda, Xu et al. 2006).

2.3.3 Funkce CHK2

Nejvíce prostudovanou drahou, které je CHK2 součástí je odpověď na dvouřetězcové zlomy ve struktuře DNA. Právě dvouřetězcové zlomy představují pro proliferující buňku významnou hrozbu, které neopraveny mohou vést k apoptóze či v případě nesprávných či neúplných oprav k chromozomálním translokacím a začátku tumorigeneze. Místo zlomu rozpoznává proteinový komplex MRN (Mre11-Rad50-NBN1) zprostředkovávající aktivaci ATM kinázy (Paull 2015). ATM následně fosforyluje řadu jaderných proteinů s DNA reparační aktivitou nebo aktivuje další signální přenašeče v amplifikaci signálu o poškození DNA. Mezi ně řadíme i kinázu CHK2.

Nejvíce studovaným substrátem CHK2 je tumor supresorový protein p53, transkripční faktor, ovlivňující například gen *CDKN1A* kódující produkt p21, inhibitor komplexů cyklin/cyklin-dependentních kináz umožňujících vstup do další fáze buněčného cyklu. V normálním stavu

buňky je p53 rozpoznáván a vázán proteinem MDM2 (Mouse double minute homolog 2), který jej ubikvitinyluje a cílí k degradaci proteazomem. Protein p53 je stabilizován fosforylací na Ser15, který je fosforylován přímo kinázou ATM a znemožňuje vazbu MDM2 (Cheng and Chen 2010). Obdobně je p53 ovlivňován i kinázou CHK2, fosforylační místo ovlivňující rozpoznání MDM2 je Ser20 (Hirao, Kong et al. 2000). Objev propojení transkripčního faktoru p53 s kinázou CHK2 logicky vedl k experimentům, které by potvrdily navození zastavení buněčného cyklu v G1/S prostřednictvím působení CHK2 na p21.

Regulace buněčného cyklu a apoptózy ovlivněním transkripce využívá buňka pro trvalejší odpověď (Chen 2016), naopak v případě potřeby rychlé reakce dochází k alteraci aktivity CDC25 fosfatáz, duálně specifických fosfatáz odštěpujících inhibiční fosfát z cyklin-dependentních kináz (CDK) stimulující vstup do další fáze buněčného cyklu (Matsuoka, Huang et al. 1998, Donzelli and Draetta 2003). K zabránění vstupu buňky do S fáze napomáhá kináza CHK2 svou aktivitou vůči CDC25A (Falck, Mailand et al. 2001). CHK2 fosforyluje i další fosfatázu – CDC25C a podílí se tak na zabránění vstupu do mitózy (Peng, Graves et al. 1997).

Mimo zmíněné proteiny regulace buněčného cyklu, kináza CHK2 směřuje svou aktivitu i na proteiny reparační dráhy DNA. Jedním z cílů je důležitý tumor supresorový protein BRCA1 (Breast Cancer Susceptibility Protein 1) účastnící se reparace poškozené DNA zejména cestou homologní rekombinace (HR). Kináza CHK2 fosforyluje Ser988 BRCA1, a tato modifikace byla popsána jako určovatel upřednostnění opravy homologní rekombinací před nehomologním spojováním konců (NHEJ) (Lee, Collins et al. 2000, Zhang, Willers et al. 2004).

2.3.4 Hereditární mutace *CHEK2* a nádorová onemocnění

Zastoupení *CHEK2* variant se mezi různými etnickými skupinami a populacemi významně liší. Nejvyšší výskyt mutací je v bělošské populaci evropského původu, naopak nejmenší u černochoů a Asiatů (Caswell-Jin, Gupta et al. 2018).

Hereditární mutace *CHEK2* jsou nejčastěji spojovány s diagnózou karcinomu prsu. Nádory prsu mají u nosičů patogenních mutací *CHEK2* několik klinických charakteristik, mezi nimi např. zvýšené relativní riziko vzniku oboustranného karcinomu prsu oproti nenosičům, srovnatelné s rizikem mutací v *BRCA2*. Z dosavadních studií vyplývá, že patogenní mutace *CHEK2* riziko vzniku karcinomu prsu výrazně zvyšují, pokud je v rodině nosiče pozitivní nádorová historie, u nosičů patogenní mutace c.1100delC se riziko zvyšuje z 20 % až na 40 % (Cybulski, Wokolorczyk et al. 2011, Nurmi, Muranen et al. 2019).

Mutace v *CHEK2* však mohou zvyšovat riziko vzniku širšího spektra nádorů, ale s nižší penetrancí (Narod 2010). U mužů mutace v *CHEK2* zvyšují riziko vzniku karcinomu prostaty a *CHEK2* je standardně zařazen do sekvenačních panelů pro genetické vyšetření (Zhen, Syed et al. 2018). *CHEK2* se vedle *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *FANCM*, *TP53* řadí do skupiny genů podílejících se na DNA reparačních dráhách, a právě mutace v těchto genech jsou nejčastějšími u metastazujících nádorů i u neselektovaných pacientů, a jejich přítomnost se pojí s vyšším rizikem pokročilejších nádorů.

3 Seznam publikací

3.1 Publikace s IF sloužící jako podklad pro vypracování disertační práce (prvoautorské články vyznačeny):

1. Soukupova J, Zemankova P, Lhotova K, Janatova M, Borecka M, **Stolarova L**, Lhota F, Foretova L, Machackova E, Stranecky V, Tavandzis S, Kleiblova P, Vocka M, Hartmannova H, Hodanova K, Kmoch S, Kleibl Z. **Validation of CZE CANCA (CZEch Cancer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes.** PLoS One. 2018 Apr 12;13(4):e0195761. IF = 2,776
2. Burke LJ, Sevcik J, Gambino G, Tudini E, Mucaki EJ, Shirley BC, Whiley P, Parsons MT, De Leener K, Gutiérrez-Enríquez S, Santamariña M, Caputo SM, Santana Dos Santos E, Soukupova J, Janatova M, Zemankova P, Lhotova K, **Stolarova L**, Borecka M, Moles-Fernández A, Manoukian S, Bonanni B; ENIGMA Consortium, Edwards SL, Blok MJ, van Overeem Hansen T, Rossing M, Diez O, Vega A, Claes KBM, Goldgar DE, Rouleau E, Radice P, Peterlongo P, Rogan PK, Caligo M, Spurdle AB, Brown MA. **BRCA1 and BRCA2 5' noncoding region variants identified in breast cancer patients alter promoter activity and protein binding.** *Hum Mutat.* 2018 Dec;39(12):2025-2039. IF = 4,540
3. Lhotova K, **Stolarova L**, Zemankova P, Vocka M, Janatova M, Borecka M, Cerna M, Jelinkova S, Kral J, Volkova Z, Urbanova M, Kleiblova P, Machackova E, Foretova L, Hazova J, Vasickova P, Lhota F, Koudova M, Cerna L, Tavandzis S, Indrakova J, Hruskova L, Kosarova M, Vrtel R, Stranecky V, Kmoch S, Zikan M, Macurek L, Kleibl Z, Soukupova J. **Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer.** *Cancers (Basel).* 2020 Apr 13;12(4):956. IF = 6,126
4. **Stolarova L**, Jelinkova S, Storchova R, Machackova E, Zemankova P, Vocka M, Kodet O, Kral J, Cerna M, Volkova Z, Janatova M, Soukupova J, Stranecky V, Dunder P, Foretova L, Macurek L, Kleiblova P, Kleibl Z. **Identification of Germline Mutations in Melanoma Patients with Early Onset, Double Primary Tumors, or Family Cancer History by NGS Analysis of 217 Genes.** *Biomedicines.* 2020 Oct 9;8(10):404. IF = 4,717
5. Kleiblova P*, **Stolarova L***, Krizova K, Lhota F, Hojny J, Zemankova P, Havranek O, Vocka M, Cerna M, Lhotova K, Borecka M, Janatova M, Soukupova J, Sevcik J, Zimovjanova M, Kotlas J, Panczak A, Vesela K, Cervenková J, Schneiderova M, Burocziova M, Burdova K, Stranecky V, Foretova L, Machackova E, Tavandzis S, Kmoch S, Macurek L, Kleibl Z. **Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer.** *Int J Cancer.* 2019 Oct 1;145(7):1782-1797. IF = 5,229, * sdílené první autorství
6. **Stolarova L**, Kleiblova P, Janatova M, Soukupova J, Zemankova P, Macurek L, Kleibl Z. **CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate.** *Cells.* 2020 Dec 12;9(12):2675. doi: 10.3390/cells9122675. PMID: 33322746; PMCID: PMC7763663. IF = 4,366

3.2 Publikace bez IF sloužící jako podklad pro vypracování disertační práce

7. Soukupová J, Lhotová K, Zemánková P, Vočka M, Janatová M, **Stolařová L**, Borecká M, Kleiblová P, Macháčková E, Foretová L, Koudová M, Lhota F, Tavandzis S, Zikán M, Stránecký V, Veselá K, Panczak A, Kotlas J, Kleibl Z. **Contribution of Massive Parallel Sequencing to Diagnosis of Hereditary Ovarian Cancer in the Czech Republic.** *Klin Onkol.* 2019 Summer;32(Supplementum2):72-78.

8. Kleiblová P, **Stolařová L**, Křížová K, Lhota F, Hojný J, Zemánková P, Havránek O, Vočka M, Černá M, Lhotová K, Borecká M, Janatová M, Soukupová J, Ševčík J, Zimovjanová M, Kotlas J, Panczak A, Veselá K, Červenková J, Schneiderová M, Burócziová M, Burdová K, Stránecký V, Foretová L, Macháčková E, Tavandzis S, Kmoch S, Macůrek L, Kleibl Z. **Germline CHEK2 Gene Mutations in Hereditary Breast Cancer Predisposition - Mutation Types and their Biological and Clinical Relevance**. *Klin Onkol*. 2019 Summer;32(Supplementum2):36-50.

3.3 Další spoluautorské publikace vytvořené v průběhu PgS

9. Aquino Perez C, Palek M, **Stolarova L**, von Morgen P, Macurek L. **Phosphorylation of PLK3 Is Controlled by Protein Phosphatase 6**. *Cells*. 2020 Jun 20;9(6):1506. IF = 4,366
10. Vocka M, Zimovjanova M, Bielcikova Z, Tesarova P, Petruzzelka L, Mateju M, Krizova L, Kotlas J, Soukupova J, Janatova M, Zemankova P, Kleiblova P, Novotny J, Konopasek B, Chodacka M, Brychta M, Sochor M, Smejkalova-Musilova D, Cmejlova V, Kozevnikovova R, Miskarova L, Argalacssova S, **Stolarova L**, Lhotova K, Borecka M, Kleibl Z. **Estrogen Receptor Status Oppositely Modifies Breast Cancer Prognosis in BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers Versus Non-Carriers**. *Cancers (Basel)*. 2019 May 28;11(6):738. IF = 6,126

4 Komentář k vybraným publikovaným pracím

4.1 **Publikace 1: Validation of CZE CANCA (CZEch Cancer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes.**

Soukupova J, Zemankova P, Lhotova K, Janatova M, Borecka M, **Stolarova L**, Lhota F, Foretova L, Machackova E, Stranecky V, Tavandzis S, Kleiblova P, Vocka M, Hartmannova H, Hodanova K, Kmoch S, Kleibl Z. *PLoS One*. 2018 Apr 12;13(4):e0195761.

Moderní technologie masivního paralelního sekvenování nové generace dnes plně nahradila přístup analýzy mutací postupně po jednotlivých genech. Rozhodli jsme se vytvořit panel CZE CANCA cílicí geny, které mají souvislost s nádorovými syndromy, a který by byl využitelný pro klinickou diagnostiku nádorové predispozice. Před uvedením do laboratorní praxe a klinické diagnostiky bylo nezbytné určit senzitivitu, specifickou a přesnost analýzy tímto panelem. Vyhodnocení těchto parametrů bylo hlavní náplní našeho sdělení. Mým dominantním podílem byla příprava vzorků a následná příprava sekvenačních knihoven.

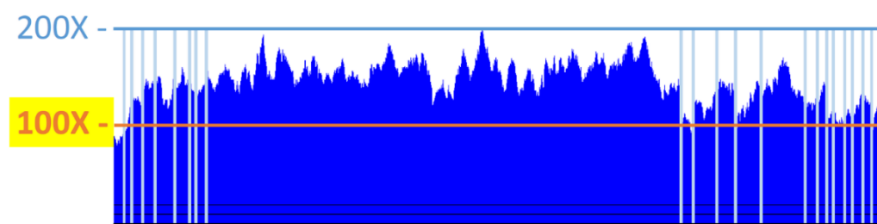
Panel CZE CANCA obsahoval ve své první verzi 219 cílových genů, u nichž byly pokryty všechny kódující exony včetně přilehlých intronových oblastí.

Pro validaci panelu bylo zvoleno 389 již dříve testovaných vzorků, z nichž 137 obsahovalo patogenní mutaci nebo krátkou delecí či inzerci, 217 bylo testováno negativně a 35 vzorků obsahovalo dříve charakterizované intragenové přestavby.

Aby bylo možné analyzovat paralelně vyšší počet vzorků dohromady, bylo nutné označit fragmenty DNA od jednotlivých pacientů unikátními DNA identifikátory (tzv. barkódy) pomocí liganční PCR (ligation-mediated PCR, LM PCR) v 5 cyklech. Pro inkubaci s hybridizačními sondami pro nabohacení cílových sekvencí byly vzorky multiplexovány.

Pro sekvenování jsme cílili na pokrytí 100×. Finální knihovna byla sekvenována systémem MiSeq platformy Illumina.

Bioinformatické zpracování bylo prováděno našimi bioinformatiky pomocí veřejně dostupných mapovacích (Novoalign) a anotačních (ANNOVAR) programů v ucelené bioinformatické kaskádě zahrnující recalibrace dat (GATK) a odstranění PCR duplikátů. Přítomnost identifikovaných variant byla kontrolována v externích frekvenčních databázích a hodnocena vybranými predikčními *in silico* programy. Přítomnost intragenových přestaveb (CNV) byla hodnocena pomocí CNVkit (Obr. 1). Pro tuto analýzu je zásadní uniformita pokrytí sekvenovaných úseků. Pokrytí jednotlivých vzorků bylo vizualizováno programem R ve skriptu Boudalyzer vytvořeném naší bioinformatičkou, což umožňuje velmi rychlou kontrolu pokrytí jednotlivých vyšetřovaných genů.



Obr. 1. Vizualizace pokrytí genu *BRCA1* v programu Boudalyzer při rutinní analýze cílicí na průměrné pokrytí 100× ukazující velmi homogenní pokrytí všech 22 exonů (oddělených světle modrými úseky)

Validačními nástroji se nám podařilo prokázat, že analýza panelem CZECANCA je dostatečně spolehlivá, specifická a senzitivní pro nasazení do rutinní klinické praxe. Uniformita laboratorní analýzy a následného bioinformatického způsobu zpracování v jednotlivých centrech využívajících panel CZECANCA je důležitým předpokladem pro tvorbu frekvenční databáze hereditárních variant u rizikových pacientů.

4.2 **Publikace 2: BRCA1 and BRCA2 5' noncoding region variants identified in breast cancer patients alter promoter activity and protein binding.**

Burke LJ, Sevcik J, Gambino G, Tudini E, Mucaki EJ, Shirley BC, Whiley P, Parsons MT, De Leener K, Gutiérrez-Enríquez S, Santamariña M, Caputo SM, Santana Dos Santos E, Soukupova J, Janatova M, Zemankova P, Lhotova K, Stolarova L, Borecka M, Moles-Fernández A, Manoukian S, Bonanni B; ENIGMA Consortium, Edwards SL, Blok MJ, van Overeem Hansen T, Rossing M, Diez O, Vega A, Claes KBM, Goldgar DE, Rouleau E, Radice P, Peterlongo P, Rogan PK, Caligo M, Spurdle AB, Brown MA. Hum Mutat. 2018 Dec;39(12):2025-2039.

V rámci mezinárodní spolupráce s kolegy z konsorcia ENIGMA jsme se podíleli na analýze 5' nekódující oblasti genů *BRCA1* a *BRCA2* u více než 6000 pacientek s karcinomem prsu v nízkém věku nebo s nádorovou historií v rodině, které nenesly mutaci v kódující oblasti těchto genů. V naší laboratoři jsme panelem CZECANCA analyzovali téměř 3000 pacientek a více než 300 kontrol, které tvořily podstatnou část hodnoceného souboru.

Celkem bylo identifikováno 141 raritních variant promotorů, 76 zcela nově. Kolegové z konsorcia ENIGMA provedli sérii *in silico* analýz a prioritizovali 21 variant, které mohou mít vliv na regulaci transkripce a asociaci s DNA-vazebnými doménami transkripčních faktorů.

Čtyři varianty vykazovaly pozměněnou aktivitu promotoru v luciferázové eseji v buněčných liniích oproti wild-type variantám. Výsledky retardační analýzy (electrophoretic mobility shift assay; EMSA) u tří z těchto variant, prokázala vliv na vazbu transkripčního faktoru NFYA na CCAAT-box v promotoru *BRCAl* a vazbu transkripčního faktoru PAX5 na promotor *BRCA2*. Nicméně, následné genetické analýzy výskytu těchto variant neprokázaly jejich zvýšenou četnost u pacientek s karcinomem prsu ve srovnání s kontrolami.

4.3 **Publikace 3: Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer.**

Lhotova K, **Stolarova L**, Zemankova P, Vocka M, Janatova M, Borecka M, Cerna M, Jelinkova S, Kral J, Volkova Z, Urbanova M, Kleiblova P, Machackova E, Foretova L, Hazova J, Vasickova P, Lhota F, Koudova M, Cerna L, Tavandzis S, Indrakova J, Hruskova L, Kosarova M, Vrtel R, Stranecky V, Kmoch S, Zikan M, Macurek L, Kleibl Z, Soukupova J. *Cancers* (Basel). 2020 Apr 13;12(4):956.

V naší studii jsme pomocí sekvenačního panelu CZECANCA analyzovali 1333 pacientek s karcinomem ovaria, zaměřili jsme se na systematický popis dědičné nádorové predispozice u pacientek z ČR. Výskyt germinálních alterací u pacientek byl porovnáván s prevalencí těchto variant v souboru 2278 kontrol.

Primárně jsme se zaměřili na hodnocení 18 predispozičních genů ke karcinomu prsu a ovaria uvedených v NCCN doporučeních, která jsou podkladem pro národní doporučení (Foretova, Navratilova et al. 2019). V těchto genech jsme identifikovali 441 mutací u 427/1333 (32 %) pacientů a 58/2278 (2,5 %) kontrol.

Nejvyšší frekvenci dědičných mutací jsme našli u pacientů, kteří byli diagnostikováni ve věku 40-49 a 50-59 (37,4 % a 40,7 %), naopak nejnižší u nejmladších pacientů s věkem do 30 let (8,3 %). Za zajímavé a klinicky významné zjištění považujeme, že *BRCA1/2* mutace byly významně častější u starších pacientek nad 70 let než u pacientek mladších 30 let. Nejnižší medián věku diagnózy (46 let) jsme pozorovali u nosičů mutací v genech Lynchova syndromu (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*).

Mutace v genech *BRCA1/2*, *RAD51C/D*, *BARD1* a geny mismatch opravných mechanismů zvyšovaly riziko vzniku karcinomu ovaria významně (OR>5). Mutace v *BRCA1/2* genech byly identifikovány u 84 % nosičů mutací a byly nejčastější alterací u 17,9 % a 7,4 % pacientů. Mutace v dalších z hlavních predispozičních genů, především *RAD51C/RAD51D/BRIP1*, jsme našli u přibližně 5 % pacientů. Zvýšené riziko karcinomu ovaria jsme pozorovali u nosičů variant v *NBN* a *BARD1*, naopak mutace v *ATM* a *PALB2* v našem souboru riziko významně nezvyšovaly. Oproti našim předešlým poznatkům jsme nezaznamenali významný rozdíl v rozložení variant *CHEK2* u pacientů a kontrol. Mutace v některých z hlavních

predispozičních genů jsou velmi raritní (*STK11*, *PTEN*) a pro přesné zhodnocení rizika bychom potřebovali větší studovaný soubor.

Výsledky naší analýzy umožnily zhodnotit spektrum hereditárních alterací podmiňujících vznik dědičných karcinomů ovaria. Potvrdily, že dědičná forma vzniká u téměř třetiny patientek, což jasně ukazuje, že genetické testování je indikováno u všech nemocných s tímto onemocněním bez ohledu na věk pacientky, onkologickou rodinou anamnézu, či histologický typ karcinomu ovaria. Překvapivým zjištěním je malý počet nosiček germinálních mutací u nejmladších dospělých patientek.

4.4 Publikace 4: Identification of Germline Mutations in Melanoma Patients with Early Onset, Double Primary Tumors, or Family Cancer History by NGS Analysis of 217 Genes.

Stolarova L, Jelinkova S, Storchova R, Machackova E, Zemankova P, Vocka M, Kodet O, Kral J, Cerna M, Volkova Z, Janatova M, Soukupova J, Stranecky V, Dundr P, Foretova L, Macurek L, Kleiblova P, Kleibl Z. *Biomedicines*. 2020 Oct 9;8(10):404.

Pro naši analýzu jsme vytvořili sekvenční panel CZMELAC cílicí 217 genů, přičemž osm z nich jsou vysoce až středně rizikové predispoziční geny pro vznik melanomu, 26 nízko rizikových a dále pak 37 genů, které predisponují k jinému nádorovému onemocnění a 146 genů spojených s melanomem, ale s neznámým vlivem na hereditární složku onemocnění. Analýzu jsme provedli u 264 rizikových pacientů s diagnózou maligního melanomu, což zahrnovalo nemocné s časným nástupem onemocnění (do 25 let), pacienty s mnohočetným melanomem, pacienty s multiplicitou melanomu a dalšího nádorového onemocnění.

Patogenní či pravděpodobně patogenní (class 4/5) varianty jsme identifikovali u 31/264 (11,7 %) pacientů s melanomem (u 35/1479, tj. 2,3 % kontrol), ve vysoce až středně rizikových genech u devíti pacientů (3,4 %) a u 22 pacientů (8,3 %) v genech predisponujícím k jiným nádorovým onemocněním. Dle předpokladu, ve skupině vysoce až středně rizikových genů byly nejčastěji zastoupeny mutace v genu *CDKN2A* a to u šesti pacientů. Všichni tito pacienti měli v rodině příbuzného s nádorovým onemocněním, z čehož v pěti případech se jednalo o alespoň jednoho příbuzného s melanomem. Dalším ze skupiny klinicky významných genů je *POT1* (protection of telomere 1), jehož proteinový produkt POT1 rozpoznává a interaguje s jednořetězcovými úseky repetitivních sekvencí telomer a prostřednictvím TPP1 s proteiny shelterinového komplexu (Kendellen, Barrientos et al. 2009). V našem souboru jsme identifikovali missense variantu p.P116L u pacienta s mnohočetným melanomem a karcinomem prsu nesoucím taktéž patogenní deleční variantu v *CHEK2*. Vlastní funkční charakterizaci provedla Ing. Radka Štorchová v laboratoři školitele konzultanta (ÚMG AVČR), která prokázala, že variantní protein p.P116L je schopen normálně interagovat s TPP1 avšak nerozpoznává ssDNA. Na základě těchto analýz se domníváme, že varianta p.P116L je pravděpodobně patogenní missense varianta (class 4).

V rámci vyšetření pacientů s melanomem jsme identifikovali jasně patogenní varianty i vzácné missense mutace v genu *CHEK2*. Význam jeho germinálních alterací v patogenezi familiárních forem melanomu je stále sporný (Bui, LeBoeuf et al. 2021). Nalezené vzácné missense varianty (p.T133A a p.Y297D), které jsme doposud u pacientů z ČR nezaznamenali, jsme podrobili funkční analýze v buněčném modelu s delecí endogenních wild-type alel *CHEK2*, která je detailně popsána v následujícím (leč časově předcházejícím) článku. V porovnání s wild-type formou proteinu nevykazovaly nové varianty p.T133A a p.Y297D sníženou katalytickou aktivitu a tudíž jsme je nepovažovali za patogenní varianty zvyšující riziko vzniku melanomu.

Výsledky naší analýzy ukázaly, že přítomnost mutací ve vysoce-středně penetrantních genech (*CDKN2A*, *POT1*, *ACD*) se podílejí na klinicky významném zvýšení rizika vzniku melanomu (OR = 52,2; 95%CI 6,6–413,1); $P=3,2 \times 10^{-7}$).

4.5 Publikace 5: Identification of deleterious germline *CHEK2* mutations and their association with breast and ovarian cancer.

Kleiblova P*, **Stolarova L***, Krizova K, Lhota F, Hojny J, Zemankova P, Havranek O, Vocka M, Cerna M, Lhotova K, Borecka M, Janatova M, Soukupova J, Sevcik J, Zimovjanova M, Kotlas J, Panczak A, Vesela K, Cervenкова J, Schneiderova M, Burocziova M, Burdova K, Stranecky V, Foretova L, Machackova E, Tavandzis S, Kmoch S, Macurek L, Kleibl Z. *Int J Cancer*. 2019 Oct 1;145(7):1782-1797.

* sdílené první autorství

V této studii jsme analyzovali výskyt dědičných variant v genu *CHEK2* u 1928 vysoce rizikových pacientek s karcinomem prsu a ovaria. Výskyt alterací jsme porovnali s prevalencí germinálních variant v souboru 3360 osob kontrolního souboru z ČR, protože významné populační rozdíly v zastoupení výskytu variant *CHEK2* genu znemožňují použití frekvence výskytu v kontrolních souborech uvedených ve veřejně dostupných databázích. Nerespektování populačních specifik značně zkresluje výpočet relativního rizika vzniku studovaných nádorů pro nosiče mutací v genu *CHEK2*.

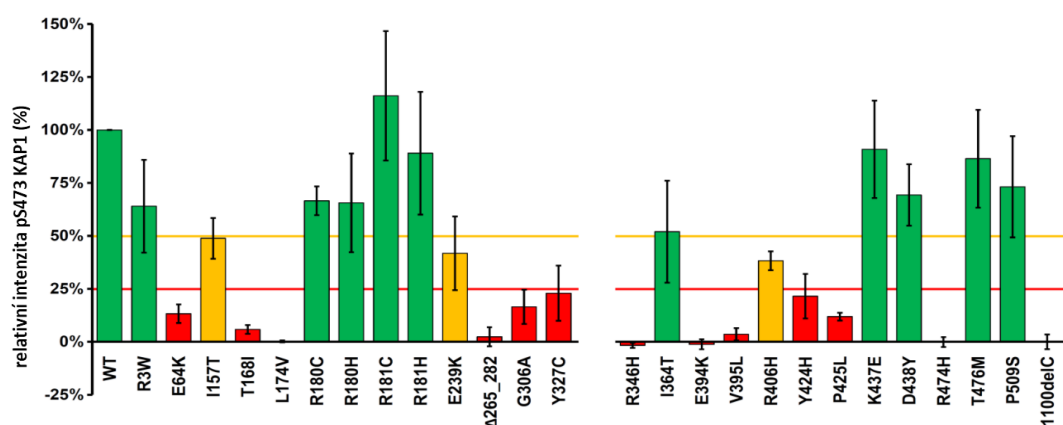
Ve studovaném souboru jsme u 46 pacientů (2,39 %) a 11 kontrol (0,33 %) identifikovali 10 variant zkracujících polypeptidový řetězec. Nadto jsme identifikovali 26 různých missense variant VUS se srovnatelnou frekvencí u pacientů a kontrol - 88 pacientů (4,56 %) a 131 kontrol (3,90 %).

Biologický význam missense variant jsme charakterizovali pomocí funkční analýzy v buněčné linii odvozené od lidských netransformovaných buněk sítnice imortalizovaných pomocí zvýšené exprese telomerázy (linie RPE1). V těchto buňkách jsme přístupem CRISPR/Cas9 vytvořili knockout genu *CHEK2*. Do výsledných buněk RPE1-*CHEK2*-KO jsme následně transientně transfekovali variantní kinázy spolu s kontrolami (wild-type kináza a prázdný vektor s EGFP) a jejich aktivitu jsme měřili jako schopnost fosforylovat endogenní substrát Ser473 KAP1, což jsme detekovali imunofluorescenčně pomocí ScanR mikroskopu.

Tento systém jsme se doplnili o podpůrnou analýzu *in vitro*, kdy jsem překlonovala wild-type a mutantní varianty do vektoru pGEX-6P-1, které byly poté transformovány do *E. coli* BL21. Purifikované variantní kinázy poté byly inkubovány se substrátem GST-KAP1 v kinázovém pufru. Fosforylace Ser473 KAP1 byla detekována pomocí western blotu.

Analýzy byly nadto obohaceny o výsledky experimentů komerčně dostupné *in vitro* kinázové analýzy Omnia kinase assay (Invitrogen) v bakteriálních lyzátech, jejíž metodiku jsem již zpracovala v rámci své diplomové práce.

Nejvyšší váhu výsledku jsme uvažovali v případě analýzy v RPE1-*CHEK2*-KO buňkách, kterou považujeme za nejvíce vypovídající, jelikož jsou v nenádorové buněčné linii zachovány fyziologické buněčné procesy a jsou přítomni interakční partneři *CHK2* důležití pro jeho funkci a aktivaci. Tímto přístupem jsme byli schopni rozlišit aktivitu variant do tří skupin – nefunkční, snížená aktivita a plně zachovaná aktivita (Obr. 2).



Obr. 2. Výsledná aktivita identifikovaných variant v analýze fosforylace endogenního substrátu S473 KAP1 v RPE1-*CHEK2*-KO buňkách. 100% aktivity znázorňuje wild-type *CHK2*.

Takto jsme klasifikovali 11 variant u 15 (0,78 %) pacientů a 6 (0,18 %) kontrol jako varianty funkčně patogenní. Frekvence variant s plně zachovanou a částečně sníženou aktivitou se mezi skupinami pacientů a kontrol významně nelišily.

Nosičství hereditárních mutací v genu *CHEK2* je v případě trunkačních mutací klinicky významné pro vznik a rozvoj karcinomu prsu u žen i mužů. Námi klasifikované funkčně patogenní missense varianty jsou více zastoupeny u pacientů. Pro určení vlivu a asociace s karcinomem ovaria budou nutné další studie na větším souboru.

4.6 Publikace 6: *CHEK2* Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate.

Stolarova L, Kleiblova P, Janatova M, Soukupova J, Zemankova P, Macurek L, Kleibl Z. *Cells*. 2020 Dec 12;9(12):2675.

V přehledovém článku jsme se rozhodli shrnout současné znalosti o významu genu *CHEK2* a jeho proteinovém produktu, kináze *CHK2*, v perspektivě predispozice ke vzniku nádorových

onemocnění. Zabývali jsme se především výskytem dědičných alterací *CHEK2* genu v různých populacích a u pacientů s různými onkologickými diagnózami.

Protože dědičné varianty genu *CHEK2* byly nalezeny u různých souborů pacientů s různými testovanými nádorovými onemocněními, je v současnosti vyšetření tohoto genu součástí rutinních sekvenačních panelů v diagnostice hereditárních syndromů, kde se *CHEK2* řadí mezi geny s nejvyšší frekvencí zárodečných alterací, především v bělošských populacích. S nástupem NGS se spektrum identifikovaných variant značně rozrostlo, především o vzácné missense varianty nejasného významu se značně variabilní populační prevalencí.

Výsledky dosavadních analýz ukazují, že pro klinicky hodnověrné zhodnocení rizika spojeného s nosičstvím dědičných patogenních variant v genu *CHEK2* bude nezbytné provést další analýzy, které budou na rozdíl od analýz publikovaných v minulosti obsahovat i dostatečný počet populačně specifických kontrol. Výpočty rizik s použitím souborů mnohonárodních populačních kontrol je s ohledem na vysokou populační variabilitu spektra variant v *CHEK2* nepřesné. Dalším problémem, který čeká na řešení, je klinické hodnocení *CHEK2* VUS.

5 Diskuze

Nádorová onemocnění představují v současné době druhou nejčastější příčinu úmrtí ve vyspělých zemích. Ačkoliv většina nemocných s onkologickými diagnózami vyvine sporadickou formou nádorů, pacienti s dědičnými nádorovými onemocněními tvoří malou, ale klinicky významnou skupinu nemocných. Význam přesahující numerický podíl 5-10% vyplývá především ze skutečnosti, že vznik onkologického onemocnění u nosičů patogenních mutací je výrazně vyšší, než u běžné populace a onemocnění vzniká v atypicky mladém věku. Z těchto důvodů se nádorové onemocnění u nepoznaných nosičů mutací s nespecifickými příznaky může zaměnit za neonkologickou diagnózu. Onkologické onemocnění u mladých osob je tak často odhaleno až v pokročilém stádiu, které je nákladné na poskytovanou péči a prognosticky nepříznivé s vysokým rizikem úmrtí, a tím i se zvyšujícími se nepřímými náklady a negativními socioekonomickými dopady. Identifikace nádorové predispozice je proto jednou z důležitých strategií prevence vzniku nádorových onemocnění, jejichž incidence v populaci neustále stoupá.

Při přechodu z postupných analýz jednotlivých genů k analýze pomocí NGS v naší laboratoři jsme se rozhodli pro panel, který by umožňoval identifikaci nádorové predispozice u všech nejčastěji analyzovaných onkologických pacientů. Zvolili jsme formát panelu s plánovanými 226 geny, kde se nám v prvních verzích podařilo z důvodu neunikátních nebo komplikovaných (GC-rich) oblastí pokrýt 219 cílových genů (Soukupova, Zemankova et al. 2016). V dalších fázích, se zlepšováním optimalizační strategie pro přípravu sond, jsme dosáhli plného pokrytí 226 genů. Před klinickým nasazením bylo nutné panel důkladně otestovat a určit jeho kvalitativní a kvantitativní parametry (Soukupova, Zemankova et al. 2018). Robustnost přístupu umožnila nabídnout použití panelu i ostatním diagnostickým centrům v ČR, která se společně podílejí na vzniku populační databáze a klinické interpretaci nalezených variant.

V poslední verzi (5.0 z roku 2020) databáze obsahuje genotypy a fenotypová data od 10 480 pacientů analyzovaných panelem CZEKANCA.

Zásadní diagnostické rozpaky tvoří především VUS varianty, které se nacházejí v genech se známými patogenními variantami souvisejícími s onemocněním, obzvláště u pacientů s výrazným fenotypem a nepřítomností jasně patogenních mutací. Hodnocení a klinická interpretace VUS variant je obtížná časově i metodicky. S ohledem na jejich raritní výskyt vyžadují genetické přístupy, hodnotící frekvenci VUS v populacích pacientů a kontrol či jejich segregaci v rodinách nosičů, mezinárodní spolupráci, např. konsorcium ENIGMA - Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles; (Spurdle, Healey et al. 2012). Nástroje *in silico* predikčních algoritmů se sice postupně zlepšují, ale jejich význam spočívá především v případné prioritizaci variant pro další analýzy. K hodnocení klinického významu jednotlivých VUS nejsou vhodné. Velmi spolehlivé, ale rovněž časově a metodicky nejnáročnější, jsou funkční analýzy.

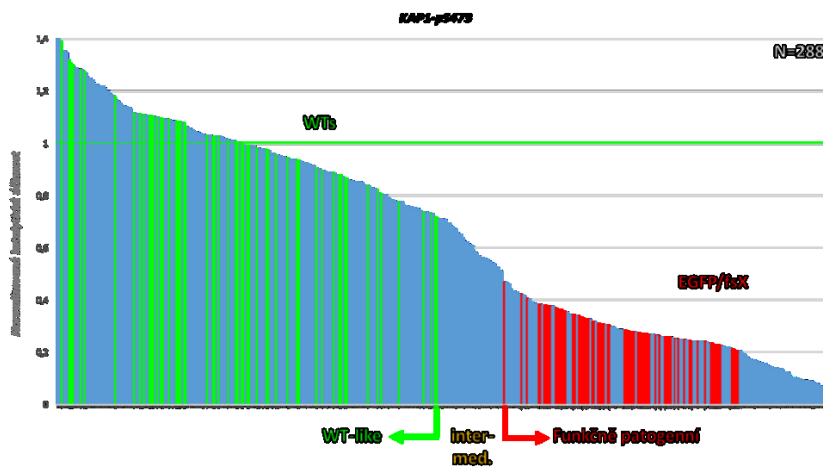
V našem souboru pacientů s hereditárními nádorovými syndromy, zejména s karcinomem prsu, jsme identifikovali *CHEK2* jako třetí nejčastěji mutovaný gen po *BRCA1* a *BRCA2*. V rámci mezinárodní spolupráce jsme se podíleli na charakterizaci variant v *BRCA1*, a jelikož poptávka po funkční analýze sekvenčních variant *CHEK2* nebyla do této doby řádně uspokojena, rozhodli jsme se tohoto úkolu zhostit v naší laboratoři.

Rozhodli jsme se vytvořit nový modelový systém, jenž by byl blíže fyziologickému stavu v normálních lidských buňkách. V lidské nenádorové buněčné linii hTERT-RPE1 jsme CRISPR/Cas9 přístupem vytvořili knockout genu *CHEK2*. Do RPE1-*CHEK2*-KO buněk jsme transientně transfekovali plazmidy nesoucí varianty *CHEK2* a měřili jsme intenzitu signálu protilátky přímo úměrné fosforylaci specifického endogenního substrátu KAP1. Transkripční korepresor KAP1 je specificky fosforylován na Ser473 kinázou CHK2 (Bolderson, Savage et al. 2012, Hu, Zhang et al. 2012) v reakci na dvouřetězcová poškození genomové DNA, kdy je CHK2 aktivován. V rámci charakterizace našeho modelového systému jsme experimentálně potvrdili, že fosforylace Ser473 není přítomna u RPE1-*CHEK2*-KO ve srovnání s parentálními RPE1 buňkami v odpovědi na dvouřetězcové poškození DNA a že CHK1 kináza není v této dráze aktivována a nezastoupí CHK2.

Publikovaná funkční analýza (Kleiblova, Stolarova et al. 2019) umožňuje škálovatelnou charakterizaci většího počtu VUS v genu *CHEK2*. V rámci mezinárodní spolupráce ENIGMA konsorcia jsme od spolupracujících skupin shromáždili téměř 300 převážně missense variant, které se již podařilo zavedenou analýzou funkčně charakterizovat (Obr. 3).

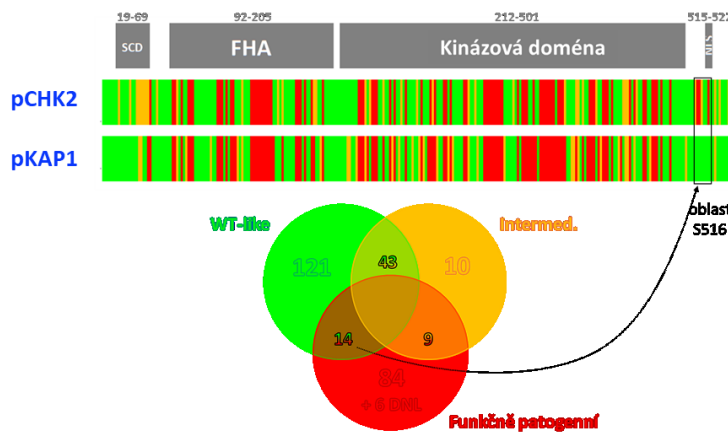
Pro větší přesvědčivost našich výsledků jsme se rozhodli, vedle hodnocení schopnosti variantních kináz fosforylovat endogenní substrát v podobě Ser473 KAP1, zhodnotit schopnost analyzovaných variant zprostředkovat autofosforylaci, která je důležitou aktivační modifikací pro plnou katalytickou účinnost CHK2 kinázy *in vivo*. Nadto se lze domnívat, že některé aminokyselinové záměny mohou ovlivňovat rozpoznání a vazbu substrátu a i při zachované enzymatické aktivitě by mohly být chybně vyhodnoceny jako katalyticky neaktivní. Kromě oblasti aktivační kličky je molekula CHK2 autofosforylována na Ser516. Fosforylaci tohoto

aminokyselinového zbytku, rozpoznávanou specifickou protilátkou, jsme zvolili pro doplňující hodnocení všech analyzovaných VUS genu *CHEK2*.



Obr. 3. Hodnocení aktivity variantních kináz CHK2 v analýze fosforylovace Ser473 KAP1. Analyzováno bylo 288 různých variant, které jsou zde seřazeny dle aktivit (od nejvyšší aktivity po nejnižší).

Soubor všech 288 analyzovaných variant jsem tedy hodnotila ve dvou různých analýzách – schopnosti autofosforylace Ser516 a fosforylace endogenního substrátu Ser473 KAP1 – aktivity byly vždy vztaheny k wild-type formě CHK2. Varianty dosahující aktivity nejméně aktivního replikátu wild-type proteinu byly považovány za aktivní, naopak varianty s aktivitou nižší než vykazovaly negativní reference c.1100delC a EGFP byly považovány za neaktivní, varianty, jejichž aktivita byla v rozmezí mezi aktivními a neaktivními byly považovány za intermediární. V obou analýzách v naprosté většině variant spolu naměřené aktivity korelovaly a mohla jsem výslednou aktivitu konkluzivně uzavřít (Obr. 4).



Obr. 4. Diagram znázorňující výsledné aktivity variantních kináz v analýze autofosforylace (pCHK2) a fosforylace Ser473 KAP1 (pKAP1). Varianty jsou seřazeny dle pozice variantní aminokyseliny v primární struktuře CHK2 v kontextu funkčních domén (nahore). Vennův diagram popisuje shodu interpretací aktivit z obou analýz. Zkrácené varianty, které nelocalizují do jádra, jsou označeny „DNL“ a jsou zahrnuty mezi funkčně patogenní.

Naše analýza je momentálně nastavena převážně na hodnocení kinázové aktivity, kterou jsme schopni robustně analyzovat. Varianty s narušenou dimerizací nejsme tímto způsobem schopni řádně vysvětlit. Tyto varianty převážně spadají do skupiny hodnocené jako intermediární a jejich fenotyp je předmětem následujících studií.

6 Závěr

Na začátku svého postgraduálního studia jsem si stanovila za cíl identifikovat genetické alterace v genu *CHEK2* u pacientek s nádorovým onemocněním, pro což jsem si osvojila metodu sekvenování nové generace. Této části jsem se intenzivně věnovala v laboratoři Onkogenetiky, kde jsem se podílela na optimalizaci postupu zpracování vzorků pro sekvenaci panelem CZEKANCA, a jeho zavedení do klinické praxe. Uniformní postup zpracování je nyní využíván několika centry v ČR, které se podílejí na tvorbě databáze identifikovaných variant a jejich ucelené reportování. Využila jsem znalost přípravy NGS knihoven v rámci spolupráce mezinárodního konsorcia ENIGMA pro sekvenaci vzorků pacientek s karcinomem prsu pro studii variant v nekódujících oblastech genů *BRCA1/2*. Nadto jsem se podílela na vývoji sekvenačního panelu CZMELAC zaměřeného na skupinu pacientů, která doposud v ČR nebyla z hlediska hereditární složky uceleně studována. Identifikovala jsem řadu variant neznámého významu v genu *CHEK2*, zejména missense, které jsem funkčně charakterizovala v Laboratoři nádorové buňky, kde jsem vytvořila a optimalizovala modelový systém pro jejich hodnocení. Na základě mezinárodní spolupráce s konsorciem ENIGMA jsme shromáždili soubor přibližně 300 missense variant *CHK2*, pro který jsem upravila systém funkční analýzy tak, aby bylo možné spolehlivě charakterizovat všechny varianty v relevantním čase. Své znalosti o genu *CHEK2* a kináze *CHK2*, kterou se intenzivně zabývám několik let, jsem využila při sepsání přehledové publikace shrnující význam *CHK2* v procesu tumorigeneze a spojení mutací v *CHEK2* s rizikem vzniku nádorových onemocnění. V dalších krocích budu vyvíjet analýzu pro funkční zhodnocení variant *CHK2*, jejichž defekt spočívá mimo kinázovou aktivitu a studovat roli *CHK2*, skrze kterou ovlivňuje procesy v buňce.

7 Literatura

- Ahn, J., Urist, M., & Prives, C. (2004). The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9), 1039-1047.
- Bolderson, E., Savage, K. I., Mahen, R., Pisupati, V., Graham, M. E., et al. (2012). Kruppel-associated Box (KRAB)-associated co-repressor (KAP-1) Ser-473 phosphorylation regulates heterochromatin protein 1beta (HP1-beta) mobilization and DNA repair in heterochromatin. *J Biol Chem*, 287(33), 28122-28131.
- Brown, A. L., Lee, C. H., Schwarz, J. K., Mitiku, N., Piwnica-Worms, H., & Chung, J. H. (1999). A human Cds1-related kinase that functions downstream of ATM protein in the cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7), 3745-3750.
- Bui, A. N., LeBoeuf, N. R., & Nambudiri, V. E. (2021). Skin cancer risk in CHEK2 mutation carriers. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 35(2), 353-359.
- Caswell-Jin, J. L., Gupta, T., Hall, E., Petrovchich, I. M., Mills, M. A., et al. (2018). Racial/ethnic differences in multiple-gene sequencing results for hereditary cancer risk. *Genet Med*, 20(2), 234-239.
- Cybulski, C., Wokolorczyk, D., Jakubowska, A., Huzarski, T., Byrski, T., et al. (2011). Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol*, 29(28), 3747-3752.
- Donzelli, M., & Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep*, 4(7), 671-677.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410(6830), 842-847.

- Foretova, L., Navratilova, M., Svoboda, M., Vasickova, P., Stahlova, E. H., et al. (2019). Recommendations for Preventive Care for Women with Rare Genetic Cause of Breast and Ovarian Cancer. *Klin Onkol*, 32(Supplementum2), 6-13.
- Foulkes, W. D. (2008). Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med*, 359(20), 2143-2153.
- Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., et al. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, 287(5459), 1824-1827.
- Hu, C., Zhang, S., Gao, X., Gao, X., Xu, X., et al. (2012). Roles of Kruppel-associated Box (KRAB)-associated Co-repressor KAP1 Ser-473 Phosphorylation in DNA Damage Response. *J Biol Chem*, 287(23), 18937-18952.
- Chaturvedi, P., Eng, W. K., Zhu, Y., Mattern, M. R., Mishra, R, et al. (1999). Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene*, 18(28), 4047-4054.
- Chen, J. (2016). The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(3), a026104.
- Cheng, Q., & Chen, J. (2010). Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell Cycle*, 9(3), 472-478.
- Janatova, M., Soukupova, J., Stribrna, J., Kleiblova, P., Vocka, M., et al. (2015). Mutation Analysis of the RAD51C and RAD51D Genes in High-Risk Ovarian Cancer Patients and Families from the Czech Republic. *PLoS One*, 10(6), e0127711.
- Kendellen, M. F., Barrientos, K. S., & Counter, C. M. (2009). POT1 association with TRF2 regulates telomere length. *Mol Cell Biol*, 29(20), 5611-5619.
- Kleiblova, P., Stolarova, L., Krizova, K., Lhota, F., Hojny, J., et al. (2019). Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2019 Oct 1;145(7):1782-1797.
- Lee, J. S., Collins, K. M., Brown, A. L., Lee, C. H., & Chung, J. H. (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*, 404(6774), 201-204.
- Li, J., Williams, B. L., Haire, L. F., Goldberg, M., Wilker, E., et al. (2002). Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2. *Mol Cell*, 9(5), 1045-1054.
- Matsuoka, S., Huang, M., & Elledge, S. J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*, 282(5395), 1893-1897.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., & Elledge, S. J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(19), 10389-10394.
- Narod, S. A. (2010). Testing for CHEK2 in the cancer genetics clinic: ready for prime time? *Clin Genet*, 78(1), 1-7.
- Nurmi, A., Muranen, T. A., Peltari, L. M., Kiiski, J. I., Heikkinen, T., et al. (2019). Recurrent moderate-risk mutations in Finnish breast and ovarian cancer patients. *Int J Cancer*, 145(10), 2692-2700.
- Oliva-Trastoy, M., Berthonaud, V., Chevalier, A., Ducrot, C., Marsolier-Kergoat, M. C., et al. (2007). The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase. *Oncogene*, 26(10), 1449-1458.
- Ouchi, M., & Ouchi, T. (2014). Distinct DNA damage determines differential phosphorylation of Chk2. *Cancer Biol Ther*, 15(12), 1700-1704.
- Paull, T. T. (2015). Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev Biochem*, 84, 711-738.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., & Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, 277(5331), 1501-1505.
- Pohlreich, P., Zikan, M., Stribrna, J., Kleibl, Z., Janatova, M., et al. (2005). High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res*, 7(5), R728-736.
- Sharpless, N. E. (2005). INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res*, 576(1-2), 22-38.
- Schwarz, J. K., Lovly, C. M., & Piwnica-Worms, H. (2003). Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *mol cancer res*, 1(8), 598-609.

- Soukupova, J., Zemankova, P., Kleiblova, P., Janatova, M., & Kleibl, Z. (2016). [CZECANCA: CZEch CAncer paNel for Clinical Application-- Design and Optimization of the Targeted Sequencing Panel for the Identification of Cancer Susceptibility in High-risk Individuals from the Czech Republic]. *Klin Onkol*, 29 Suppl 1, S46-54.
- Soukupova, J., Zemankova, P., Lhotova, K., Janatova, M., Borecka, M., et al. (2018). Validation of CZECANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS One*, 13(4), e0195761.
- Spurdle, A. B., Healey, S., Devereau, A., Hogervorst, F. B., Monteiro, A. N., et al. (2012). ENIGMA-- evidence-based network for the interpretation of germline mutant alleles: an international initiative to evaluate risk and clinical significance associated with sequence variation in BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat*, 33(1), 2-7.
- Ticha, I., Kleibl, Z., Stribrna, J., Kotlas, J., Zimovjanova, M., et al. (2010). Screening for genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2 genes in Czech high-risk breast/ovarian cancer patients: high proportion of population specific alterations in BRCA1 gene. *Breast Cancer Res Treat*, 124(2), 337-347.
- Tominaga, K., Morisaki, H., Kaneko, Y., Fujimoto, A., Tanaka, T., et al. (1999). Role of human Cds1 (Chk2) kinase in DNA damage checkpoint and its regulation by p53. *J Biol Chem*, 274(44), 31463-31467.
- Wu, X., & Chen, J. (2003). Autophosphorylation of checkpoint kinase 2 at serine 516 is required for radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 278(38), 36163-36168.
- Wybenga-Groot, L. E., Ho, C. S., Sweeney, F. D., Ceccarelli, D. F., McGlade, C. J., et al. (2014). Structural basis of Rad53 kinase activation by dimerization and activation segment exchange. *Cell Signal*, 26(9), 1825-1836.
- Zhang, J., Willers, H., Feng, Z., Ghosh, J. C., Kim, S., et al. (2004). Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, 24(2), 708-718.
- Zhen, J. T., Syed, J., Nguyen, K. A., Leapman, M. S., Agarwal, N., et al. (2018). Genetic testing for hereditary prostate cancer: Current status and limitations. *Cancer*, 124(15), 3105-3117.