

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



UNIVERZITA KARLOVA
I. lékařská fakulta

Mgr. Lenka Stolařová

Analýza nádorové predispozice a funkční analýza variant nejasného významu

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

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, PhD.

Konzultant: MUDr. Libor Macůrek, PhD.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 24. 6. 2021

Lenka Stolařová

Identifikační záznam:

STOLAŘOVÁ, Lenka. *Analýza nádorové predispozice a funkční analýza variant nejasného významu. [Analysis of cancer predisposition and functional analysis of variants of unknown significance]*. Praha, 2021. 70 stran, 6 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav biochemie a experimentální onkologie. Vedoucí závěrečné práce prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, PhD.

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, CZECANCA, 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

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především mému školiteli Zdeňkovi Kleiblovi a konzultantovi Liborovi Macůrkovi za cenné rady a trpělivost, a především za jejich neutuchající nadšení do vědeckého bádání. Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegům, zejména Petře Zemánkové a Petře Kleiblové za spolupráci a podporu.

Významné poděkování patří také mým rodičům a Mirkovi.

Obsah

1	Východiska a cíle práce	8
2	Úvod	10
2.1	Hereditární nádorová onemocnění.....	10
2.2	Nádorové predispoziční geny a jejich germinální varianty	12
2.3	Gen <i>CHEK2</i> a kináza <i>CHK2</i>	14
2.3.1	Struktura <i>CHK2</i>	15
2.3.2	Regulace aktivity <i>CHK2</i>	16
2.3.3	Funkce <i>CHK2</i>	18
2.3.4	Hereditární mutace <i>CHEK2</i> a nádorová onemocnění	21
3	Metody	24
3.1	Izolace genetického materiálu	24
3.2	Sekvenování nové generace.....	24
3.3	Bioinformatická analýza.....	25
3.4	Funkční analýzy variant nejasného významu	26
4	Seznam publikací	28
4.1	Publikace s IF sloužící jako podklad pro vypracování disertační práce (prvoautorské články vyznačeny)	28
4.2	Publikace bez IF sloužící jako podklad pro vypracování disertační práce	29
4.3	Další spoluautorské publikace vytvořené v průběhu PgS	30
5	Komentář k vybraným publikovaným pracím	31
5.1	Publikace 1: Validation of CZE CANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes.....	31
5.2	Publikace 2: BRCA1 and BRCA2 5' noncoding region variants identified in breast cancer patients alter promoter activity and protein binding.	35
5.3	Publikace 3: Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer.....	37
5.4	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.	40
5.5	Publikace 5: Identification of deleterious germline <i>CHEK2</i> mutations and their association with breast and ovarian cancer.....	44
5.6	Publikace 6: <i>CHEK2</i> Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate.	48
6	Diskuze	50
7	Závěr	59
8	Literatura	60
9	Přílohy: vybrané publikované práce <i>in extenso</i>	70

Seznam zkratek

ARID1A:	AT-Rich Interactive Domain-Containing protein 1A
ATM:	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR:	Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related
AURKB:	Aurora Kinase B
BAM:	Binary Alignment Map
BCAC:	The Breast Cancer Association Consortium
BRCA1/2:	Breast Cancer Susceptibility Protein 1/2
CDK:	Cyclin Dependent Kinase
ClinVar:	Clinical Variant
CNV:	Copy Number Variation
CRISPR/Cas9:	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR associated protein 9
CZECANCA:	CZEch CAncer paNel for Clinical Application
CZMELAC:	CZech melanoma Clinical panel
DNA-PK:	DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit
ENIGMA:	Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles
FHA:	Forkhead-associated Domain
FOXK1/2:	Forkhead Transcription Factors 1/2
HP1:	Heterochromatin Protein 1
HR:	Homology Recombination
HRM:	High Resolution Melting
KAP1:	KRAB (Krüppel-Associated Box Domain)-Associated Protein 1
LM-PCR:	Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction
MDM2:	Mouse Double Minute 2 Homolog
MLPA:	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MPS1:	Monopolar Spindle 1
MRN:	Mre11-Rad50-NBN1
MYPT1:	Myosin Phosphatase-Targeting Subunit 1
NCCN:	National Comprehensive Cancer Network
NGS:	Next Generation Sequencing
NHEJ:	Non-Homologous End Joining
P/CAF :	p300/CBP-Associated Factor, Lysine Acetyltransferase 2B; KAT2B
PARPi:	Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) inhibitors
PIRH2:	p53-Induced Protein with a RING-H2 Domain
POT1:	Protection of Telomere 1
PP1:	Protein Phosphatase 1
PP2A/C:	Protein phosphatase 2A/C
PSA:	Prostate-Specific Antigen
ROS:	Reactive Oxygen Species
SAM:	Sequence Alignment Map
SCD:	SQ/TQ Cluster Domain
SIAH2 :	Seven In Absentia Homolog 2
USP28/39:	Ubiquitin Specific Peptidase 28/39
VCF:	Variant Call Format
WES:	Whole Exome Sequencing

1 Východiska a cíle práce

Laboratoř onkogenetiky, ve které jsem postgraduálním studiem navázala na témata řešená v bakalářské (Význam Chk2 kinázy ve vnitrobuněčné signalizaci a důsledky jejích poruch v onkogenezi) a diplomové práci (Funkční analýza populačně specifických sekvenčních variant genu pro kinázu kontrolního bodu buněčného cyklu *CHEK2*), se zabývá studiem hereditárních nádorů od svého založení. Za více než 20 let byla analyzována DNA od několika tisíc pacientů s nejrůznějšími dědičnými malignitami. Díky spolupráci s kolegy z klinických pracovišť se podařilo získat nejen unikátní kolekci genetického materiálu, ale i klinicko-patologické charakteristiky vyšetřovaných pacientů.

Analýzy nádorové predispozice nejprve probíhaly po jednotlivých genech. Vyšetřovaný gen či geny se volily na základě diagnózy pacienta a spektra predispozičních genů asociovaných s onemocněním. Jelikož se fenotypy i mutace nádorových syndromů překrývají, revoluční změnu v identifikaci nádorové predispozice umožnilo zavedení sekvenování nové generace (NGS) v roce 2011. NGS umožňuje rychlé a spolehlivé paralelní vyšetření i několika stovek genů.

Na našem pracovišti jsme v roce 2016 vyvinuli sekvenační panel CZE CANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application). Validace panelu CZE CANCA mi umožnila proniknout do přípravy sekvenačních knihoven (Soukupova, Zemankova et al. 2018). Povedlo se nám vytvořit robustní a spolehlivý postup pro analýzu nádorové predispozice, který sdílíme se spolupracujícími centry v rámci CZE CANCA konsorcia (www.czecanca.cz). V laboratoři jsem si následně osvojila rutinní přípravy knihoven. V návaznosti na mezinárodní spolupráci konsorcia ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles) jsme poskytli získaná data k analýze promotoru *BRCAl* - hlavního predispozičního genu ke vzniku dědičných karcinomů prsu a ovaria (Burke, Sevcik et al. 2018). Na vyšetření retrospektivních vzorků u pacientek s karcinomem ovaria analyzovaných pomocí CZE CANCA panelu jsem se podílela přípravou sekvenačních běhů a využitím údajů ze společné databáze (Soukupova, Lhotova et al. 2019, Lhotova, Stolarova et al. 2020). Zkušenosti získané analýzami vzorků pomocí panelu CZE CANCA mi umožnily rozvinout NGS analýzy dědičné predispozice u pacientů s maligním melanomem, kteří doposud nebyli v ČR testováni. Pro vyšetření jejich zárodečných mutací, jsem se podílela na návrhu a přípravě nového sekvenačního panelu CZMELAC (CZEch MELanoma Clinical panel) cíleného na geny asociované s maligním melanomem. Následně jsem provedla optimalizaci analýz, NGS u většiny vzorků v souboru

pacientů, vyhodnocení zpracovaných bioinformatických dat a statistické analýzy výsledků (Stolarova, Jelinkova et al. 2020).

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 studovaly funkční katalytickou aktivitu CHK2 kinázy *in vitro*, avšak pro hodnocení významu dědičných mutací bylo nezbytné připravit vhodnější experimentální model na živých lidských nenádorových buňkách. Z tohoto důvodu jsem zahájila spolupráci s Laboratoří biologie nádorové buňky MUDr. Libora Macůrka, Ph.D. na ÚMG AVČR. Pod jeho vedením jsem připravila funkční model založený na kvantifikaci kinázové aktivity v buňkách RPE1 s delecí endogenního lokusu *CHEK2* pomocí CRISPR/Cas9. Následně jsem funkčně vyšetřila varianty, které jsme identifikovali ve vzorcích od pacientek s karcinomem prsu a/nebo ovaria (Kleiblova, Stolarova et al. 2019, Kleiblova, Stolarova et al. 2019). Dosavadní poznatky o klinickém významu alterací *CHEK2* genu jsem shrnula v přehledném článku (Stolarova, Kleiblova et al. 2020).

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**

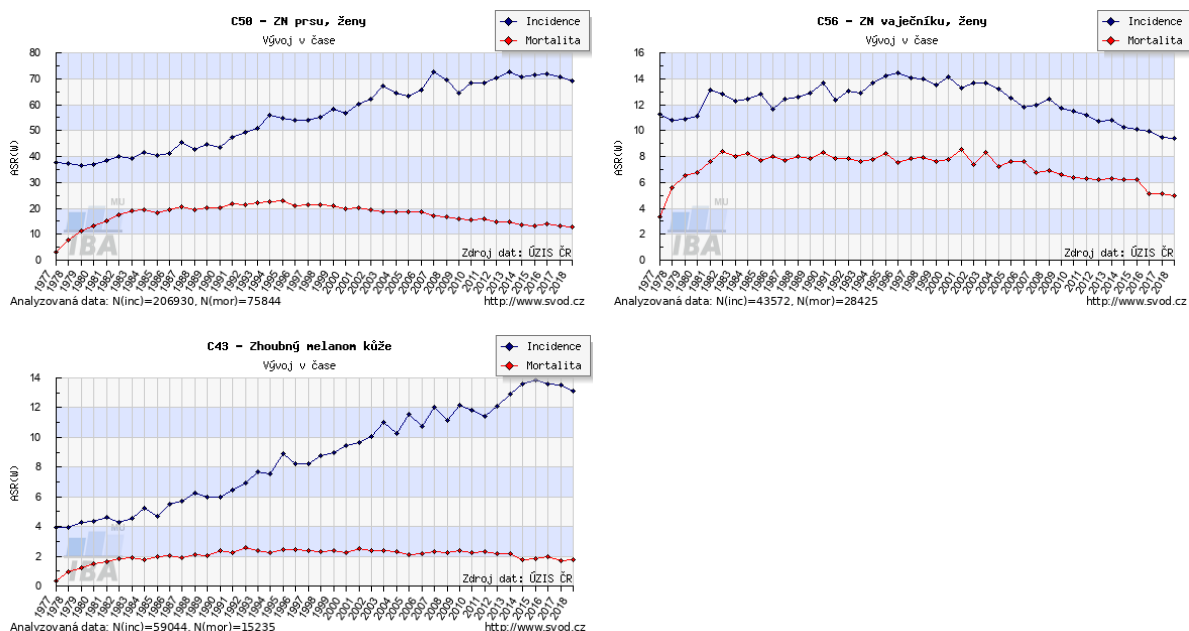
2 Úvod

2.1 Hereditární nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice. Přibližně 90-95 % případů 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. Dědičná složka se mezi různými typy nádorových onemocnění liší, nejnižším podílem 3 % u karcinomu plic a naopak nejvyšším 30 % u feochromocytomu (Rahman 2014, Stoffel and Cooney 2016).

Významnými charakteristikami hereditárních nádorových syndromů, které je odlišují od sporadických onemocnění, je brzký nástup nemoci (nezřídka do 35 let věku), opakovaný či vícenásobný výskyt nádorového onemocnění u postižené osoby a vysoký výskyt nádorových diagnóz v rodině (Kulkarni and Carley 2016). Přestože hereditární nádory tvoří minoritní složku, pacienti s mutací v predispozičních genech a jejich rodiny tvoří velmi významnou skupinu s potřebou zvýšeného sledování a prevence.

V disertační práci se dominantně věnuji analýzám nádorové predispozice u pacientek s karcinomem prsu a ovaria a u nemocných s maligním melanomem.



Obr. 1. Incidence a mortalita vybraných nádorových onemocnění. Převzato ze www.svod.cz.

Karcinom prsu je nejčastějším nádorovým onemocněním v populaci žen v ČR. Jeho incidence zaznamenala v posledních letech stabilizaci, incidence vykazuje mírný, ale systematický pokles (**Obr. 1**). Přesto karcinom prsu vzniká každoročně u více než 7000 žen a více než 1500 pacientek každoročně onemocní podlehně. Dědičná predispozice karcinomu prsu je v ČR analyzována dlouhodobě (Pohlreich, Stribrna et al. 2003). 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). Identifikace nádorové predispozice má pro nosičky patogenních mutací v obou genech významné klinické dopady. S ohledem na vysoké riziko onemocnění jsou zařazovány do preventivních sledovacích programů umožňujících včasnou detekci karcinomu prsu a dalších asociovaných nádorů (ovaria, karcinomu prostaty, pankreatu, či melanomu) nebo preventivní odstranění rizikových tkání (preventivní mastektomie nebo preventivní salpingo-ooforektomie) (Foretova, Machackova et al. 2016). Přítomnost patogenních mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* (ale i dalších genech, jejichž proteinové produkty se podílí na opravách genomové DNA) umožňuje použití cílené léčby pomocí inhibitorů poly-ADP-ribózapolymerázy (PARPi). Kromě toho jsme ve spolupráci s kolegy z klinické onkologie prokázali, že karcinomy prsu vznikající u nosiček mutací v *BRCA1* a *BRCA2*, mají v souvislosti s expresí estrogenních receptorů biologicky odlišné chování, než nádory u žen bez mutací (Vocka, Zimovjanova et al. 2019). Třetím nejčastěji mutovaným genem u pacientek s dědičným karcinodem prsu je gen *CHEK2*. Vysoká incidence karcinomu prsu, jeho různorodé biologické charakteristiky, prognostický a prediktivní význam dědičných mutací v genech predisponujících k jeho vzniku způsobuje, že karcinom prsu je z hlediska nádorové predispozice nejvíce studovaným onemocněním.

S karcinodem prsu bývá často asociován **karcinom ovaria**, který je nejsmrtelnější gynekologickou diagnózou. Přesto, že incidence onemocnění se nezvyšuje, nedaří se příliš měnit nepříznivý poměr mezi incidencí a mortalitou onemocnění (**Obr. 1**). Charakteristickou vlastností karcinomu ovaria je významný vliv hereditární složky onemocnění, která se podílí na vzniku až 25 % všech případů (Walsh, Casadei et al. 2011, Toss, Tomasello et al. 2015). Podobně jako je tomu u karcinomu prsu, jsou nejčastěji mutovanými geny u hereditární formy karcinomu ovaria geny *BRCA1* a *BRCA2*. Naše předchozí analýzy genů predisponujících ke vzniku karcinomu ovaria ukázaly, že na jeho vzniku se u pacientek v ČR podílejí rovněž ostatní predispoziční geny (Janatova, Soukupova et al. 2015).

Maligní melanom tvořil v roce 2018 8,2 % z celkového počtu nových případů všech kožních malignit, které jsou vůbec nejčastějšími onkologickými onemocněními v ČR (www.svod.cz).

Incidence onemocnění zaznamenala v ČR strmý nárůst v posledních 20 letech (Obr. 1). Kromě toho se melanom stal nejvíce rostoucím maligním onemocněním v naší dětské a adolescentní populaci (Krejci, Zapletalova et al. 2019). Na rozdíl od nemelanomových kožních nádorů s velmi nízkou mortalitou je maligní melanom nejfatálnějším typem kožních nádorů. Riziko vzniku maligního melanomu je výrazně ovlivněno individuálními faktory (dermatotyp, výskyt pih a mateřských znamének), které ovlivňují citlivost k UV záření. Vystavování kůže slunečním paprskům, zejména rizikové spálení v dětském věku, přispívá spolu s osobní anamnézou přítomnosti jiných nádorových onemocnění nebo pozitivní rodinnou onkologickou anamnézou ke zvýšenému riziku vzniku melanomu. Výskyt familiárního maligního melanomu se odhaduje na 5-10%, ale nosičů příčinných dědičných mutací v genech zvyšujících riziko maligního melanomu je nacházeno řádově méně, než je tomu u pacientů s dědičným karcinomem prsu. 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). Mutace dalších genů spojených s vysokým rizikem vzniku melanomu (*CDK4*, *BAP1*) se vyskytují velmi vzácně (celosvětově byly popsány pouze desítky případů), asociace s dědičnými alteracemi řady genů (např. geny shelterinového komplexu) byla popsána, avšak míra rizika nebyla jasně stanovena. 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

Geneticky jsou hereditární nádorová onemocnění nejčastěji spojena s mutacemi v tumor-supresorových genech. Do současné doby jich bylo popsáno několik set, avšak pouze menší část z nich je klinicky vyšetřována (Rahman 2014). Ačkoliv jsou mutace v nádorových predispozičních genech převážně děděny autozomálně dominantně, mají recesivní charakter, jelikož k rozvoji onemocnění dochází až při vyřazení obou alel genu. 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. Obecně se tak predispoziční geny dají rozdělit dle zvýšení rizika vzniku onemocnění:

- **vysoce penetrantní geny** zvyšující relativní riziko vzniku onemocnění $>4\times$
- **geny se střední penetrancí** $2-4\times$
- **geny s nízkou penetrancí** zvyšující riziko až $1,5\times$ (Stratton and Rahman 2008).

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). Vztah mezi frekvencí a penetrancí činí z dědičných nádorových syndromů poměrně obtížně detekovatelná onemocnění: časté varianty jsou klinicky nevýznamné a klinicky významné varianty jsou (s ohledem na jednotlivé predispoziční geny) vzácné. S výjimkou populačně specifických zakladatelských (founder) mutací se vrozené patogenní varianty vyskytují obvykle s frekvencí značně nižší než 1:10 000. Proto teprve zařazení NGS do vyšetřovacích algoritmů pro analýzu nádorové predispozice umožnilo získat obraz o spektru dědičných mutací podílejících se na vzniku dědičných nádorů. Přínos NGS má však i své stinné stránky, kterými je především detekce značného počtu vzácných dědičných variant bez zjevné klinické souvislosti s onemocněním, které se označují jako varianty nejasného významu (VUS).

Přesto se v případě nádorů prsu dá predispozičními geny v rámci všech zmíněných skupin penetrance vysvětlit pouze 25 % familiárních případů onemocnění; značné procento tak zůstává stále neobjasněno. Varianty ve vysoce penetrantních genech *BRCA1* a *BRCA2* objasňují dohromady pouze 3-6 % případů karcinomu prsu, dle zastoupení v dané populaci (Kleibl and Kristensen 2016). Riziko vzniku karcinomu prsu pro nosičky mutací v těchto genech je však velmi vysoké a dosahuje 70-80 % do 80 let věku (King, Marks et al. 2003).

Na základě NGS analýz se jeví, že třetím nejčastěji mutovaným genem po genech *BRCA1/2* v souboru pacientek s karcinomem prsu a ovaria v naší laboratoři, v databázi CZECANCA konsorcia, i v řadě mezinárodních studií je gen *CHEK2* (Stolarova, Kleiblova et al. 2020). Přestože se jedná o vývojově nepříbuzné geny, jejich proteinové produkty spolupracují při opravách dvouřetězcových zlomů genomové DNA pomocí homologní rekombinace. Varianty v genu *CHEK2* však nejsou výhradně spojeny s těmito tumory a mutace *CHEK2* byly nalezeny i u pacientů s nádory prostaty, kolorekta, pankreatu či osteosarkomu (Cybulski, Gorski et al. 2004). Na rozdíl od vysoce penetrantních genů *BRCA1* a *BRCA2*, jejichž roli pro vznik nádorového onemocnění nikdo nezpochybňuje, 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 VUS variant, 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.

2.3 Gen *CHEK2* a kináza *CHK2*

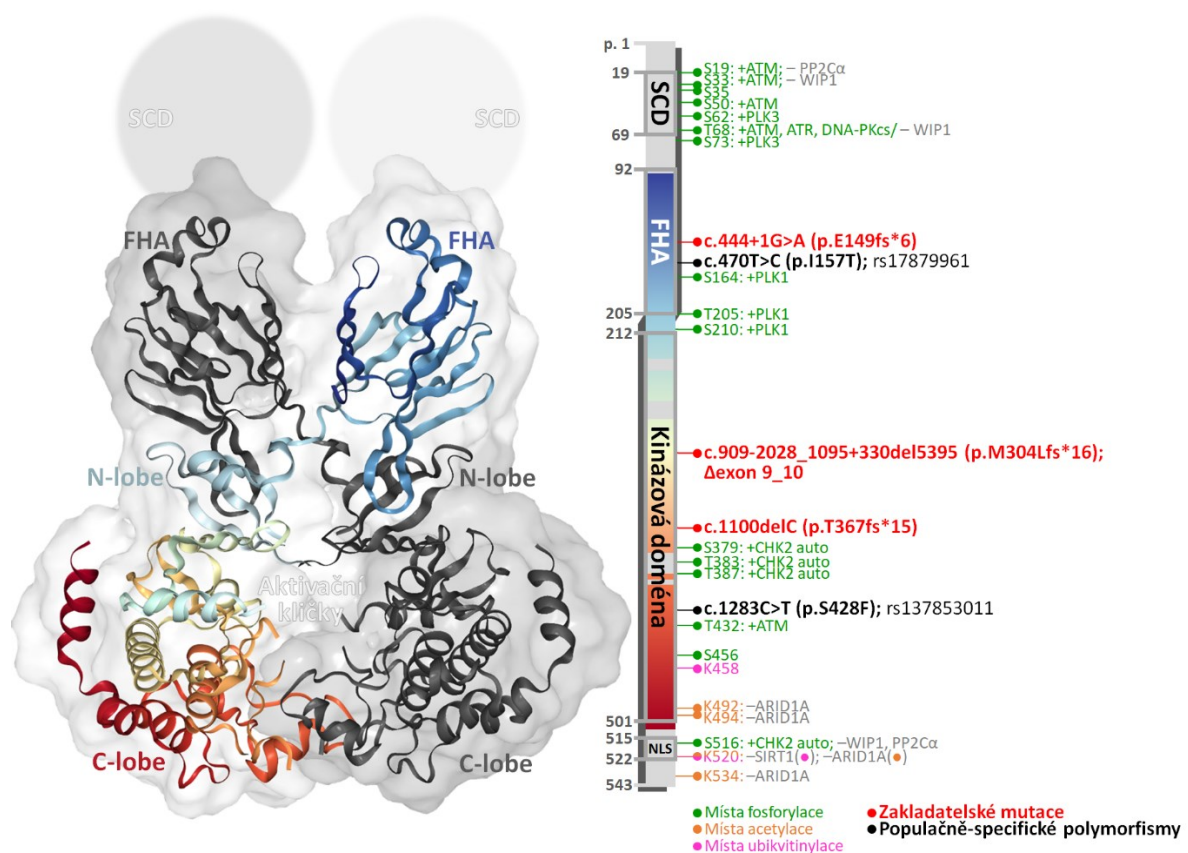
CHK2 kináza byla první popsána Matsuokou et al. v roce 1998, kteří ji identifikovali jako lidský homolog kvasinkových proteinů Rad53 u *Saccharomyces cerevisiae* a Cds1 u *Schizosaccharomyces pombe* (Matsuoka, Huang et al. 1998). Byla zasazena do signální dráhy v odpovědi na dvouřetězcová poškození DNA 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).

Zasazení nově objeveného proteinu *CHK2* do dráhy buněčné odpovědi na poškození DNA a objev asociace zárodečných variant *CHEK2* s nádorovým fenotypem podnítil jeho další studium. Následné analýzy prokázaly, že varianta c.1100delC vede k předčasnému ukončení translace proteinu, kterému tak chybí podstatná část kinázové domény a je tedy katalyticky nefunkční (Wu, Webster et al. 2001). Další studie však neprokázaly mutace v *CHEK2* jako kauzální příčinu LFS/LFL (Sodha, Williams et al. 2000, Sodha, Houlston et al. 2002, Vahteristo, Bartkova et al. 2002). V roce 2004 Cybulski a kolektiv provedli rozsáhlou analýzu souboru 4008 pacientů se 13 různými typy nádorů a 4000 kontrol. Vybrané hereditární mutace *CHEK2* genu asociovaly s výskytem řady nádorových onemocnění, včetně karcinomu prsu, prostaty, štítné žlázy, kolorekta, prostaty a nádorů ledvin (Cybulski, Gorski et al. 2004). Ačkoli dědičné varianty *CHEK2* dosahují nižší penetrance, přibližně trojnásobně zvyšují riziko vzniku řady nádorových onemocnění a lze je tak považovat za klinicky významné faktory středního rizika.

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). Exonů, jež kódují protein je 14, se začátkem translace v exonu 2, exony 11 – 14 se vyskytují v lidském genomu ve formě neexprimovaných pseudogenů (Sodha, Williams et al. 2000).

Proteinový produkt nejčastější sestřihové varianty má 543 aminokyselin a velikost 65 kDa. CHK2 ve své struktuře obsahuje tři funkční domény (Obr. 2) – SQ/TQ cluster domain (SCD), forkhead-associated domain (FHA) a kinázovou doménu (Ahn, Urist et al. 2004).



Obr. 2. Struktura dimeru CHK2 kinázy (www.rcsb.org/structure/3I6W) a funkčně a klinicky významné aminokyseliny a modifikace. Jedna podjednotka je znázorněna šedě, druhá v barevném gradientu, který odpovídá doménám znázorněným v primární sekvenci panelem vpravo (hranice domén dle Cai, Chehab et al. 2009). (podle Stolarova et al. 2020)

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), lze ji rozdělit na část tvořící strukturu β -listů obsahující Glu273 důležitý pro enzymatickou aktivitu, a část z α -helixů, ve které se nacházejí místa autofosforylace Thr383 a Thr387 v aktivační smyčce (aminokyseliny 371 – 391) (Cai, Chehab et al. 2009). Tyto dvě části kinázové domény tvoří mezi sebou žlab, do kterého se váže molekula ATP. Oproti svým kvasinkovým homologům, lidský CHK2 má pouze jeden jaderný lokalizační signál, jenž se nachází na C-konci proteinu (aminokyseliny 515 -522) a je rozpoznáván proteinem karyopherin- α 2 (*KPNA2*) pro transport do jádra (Zannini, Lecis et al. 2003).

2.3.2 Regulace aktivity CHK2

V normálním stavu se CHK2 v buňce vyskytuje v podobě neaktivního protomeru. Podnětem pro jeho aktivaci jsou dvouřetězcové zlomy ve struktuře DNA, které vznikají působením ionizačního záření, nebo působením drog etoposidu, neokarcinostatinu. V reakci na poškození kináza ATM fosforyluje CHK2 na Thr68, což umožňuje jeho rozpoznání a navázání FHA doménou druhé molekuly CHK2 a dochází k transienční dimerizaci. Tato dimerizace slouží k přechodnému přiblížení dvou protomerů CHK2, což umožní *trans*-autofosforylování 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 v důsledku ektopické nadprodukce proteinu v bakteriálních či savčích buňkách (Schwarz, Lovly et al. 2003, Kleiblova, Stolarova et al. 2019).

Významnou a hojně studovanou posttranslační modifikací je aktivační fosforylace Thr68, kterou je regulována aktivita CHK2 nadřazenou kinázou ATM. Thr68 může být taktéž fosforylován kinázou ATR *in vitro* (Matsuoka, Rotman et al. 2000) a v průběhu mitózy i kinázou DNA-PK (Shang, Yu et al. 2014). Uvádí se, že kináza PLK3 fosforyluje Ser62 a Ser73 v těsném okolí Thr68, což usnadňuje jeho přístupnost pro ATM (Bahassi el, Myer et al. 2006). V oblasti SCD domény byla popsána řada dalších fosforylací, které však nemají jasný

význam (Matsuoka, Rotman et al. 2000, Ouchi and Ouchi 2014). Fosforylovat CHK2 dokáže nejen PLK3, ale i PLK1 (Tsvetkov, Tsekova et al. 2005). Tyto fosforylace se odehrávají v mitóze, kdy PLK1 v komplexu s proteinem 53BP1 fosforyluje CHK2 na Ser164, Thr205 a Ser210 (Tsvetkov, Tsekova et al. 2005, van Vugt, Gardino et al. 2010). V cytokinezi PLK1 a CHK2 společně lokalizují v mitotickém vřeténku a na centrozomech (Tsvetkov, Xu et al. 2003).

V kvasinkách inhibují aktivační fosforylaci Rad53 kinázou ATM fosfatázy Ptc2 a Ptc3. Na základě homologie byla rozpoznána fosfatáza WIP1 v savčích buňkách defosforylující aktivovanou CHK2 kinázu (Oliva-Trastoy, Berthonaud et al. 2007). Pokusy *in vitro* ukazují, že WIP1 je schopna defosforylovat Thr68, avšak nedokáže defosforylovat threoninové zbytky v aktivační kličce (Fujimoto, Onishi et al. 2006, Yoda, Xu et al. 2006). Fosfatáza WIP1 tak není schopna účinně defosforylovat již plně aktivované molekuly CHK2. Lze se domnívat, že WIP1 nepotlačuje primárně odpověď na poškození DNA zprostředkovanou kinázami ATM/ATR, ale podílí se spíše na překonání kontrolního bodu buněčného cyklu. V normálních nepoškozených buňkách ATM aktivitu antagonizují fosfatázy WIP1, PP2A a PP1, které účinně defosforylují CHK2. Další autofosforylační místo Ser516 je pro defosforylaci přístupnější nejen pro WIP1, ale také pro fosfatázu PP2C (Carlessi, Buscemi et al. 2010).

Ačkoli je fosforylace nejvíce prostudovanou posttranslační úpravou, aktivita CHK2 je ovlivněna i dalšími modifikacemi včetně ubikvitinace. Bazální hladina CHK2 je udržována pomocí E3 ubikvin-ligázy SIAH2 (Seven In Absentia Homolog 2), jež cílí CHK2 k degradaci v proteazomu (Garcia-Limones, Lara-Chica et al. 2016). V odpovědi na poškození DNA ionizačním zářením či působením cisplatin je CHK2 naopak udržován deubikvitinylací pomocí ubikvitin-specifických peptidáz USP28 a USP39 (Wu, Chen et al. 2019, Wang, Yang et al. 2020) a zároveň je stabilita CHK2 zvýšena díky fosforylaci na Ser456 (Kass, Ahn et al. 2007). Po ukončení reparační signalizace je defosforylace tohoto místa vyžadována pro rozpoznání E3 ubikvitin-ligázou PIRH2 (p53-Induced Protein with a RING-H2 Domain) spolu s proteiny MDM2 (Mouse Double Minute 2 Homolog) a P/CAF (p300/CBP-Associated Factor, Lysine Acetyltransferase 2B; KAT2B), jenž je jedním z proteinů remodelujících chromatin (Kass, Poyurovsky et al. 2009, Bohgaki, Hakem et al. 2013). Dalším proteinem se schopností ovlivňovat strukturu chromatinu je ARID1A (AT-Rich Interactive Domain-Containing Protein 1A), který polyubikvitinyluje CHK2 na zbytecích Lys492, Lys494, Lys520 a Lys534 (Wang, Yang et al. 2020). Somatické mutace ARID1A patří mezi jedny z nejčastějších a právě jeho ztráta může tímto mechanismem vést ke zvýšení hladiny CHK2 v těchto nádorech. Modifikace

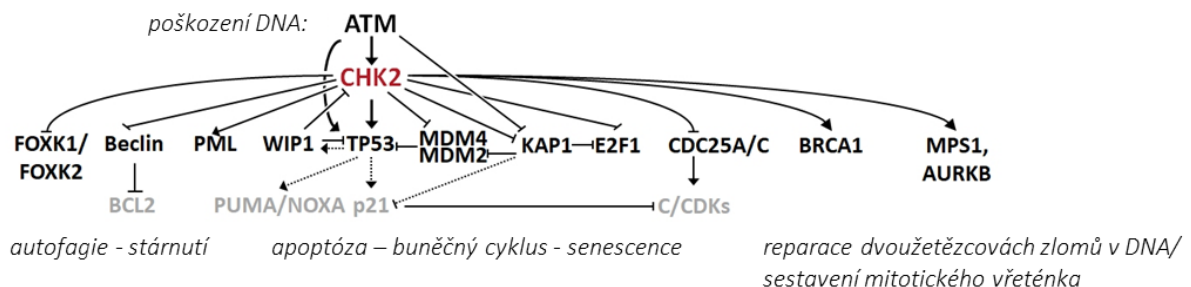
ubikvitinylací nemusí mít nutně vliv pouze na stabilitu a degradaci CHK2, takovýmto příkladem je komplex ubikvitin ligáz s CUL1 rozeznává kinázu CHK2 fosforylovanou na Ser379, a má nejspíše vliv na funkci proteinu v procesu apoptózy v odpovědi na ionizační záření (Lovly, Yan et al. 2008).

Acetylace CHK2 nebyla doposud výrazně prostudována, byla však popsána interakce CHK2 s histon-deacetylázou SIRT1, která odejímá acetylovou skupinu z Lys520, což potlačuje možnost aktivační fosforylace v okolí (Magni, Ruscica et al. 2014, Alves-Fernandes and Jasiulionis 2019).

2.3.3 Funkce CHK2

Schopnost aktivované kinázy CHK2 fosforylovat své cílové substráty závisí na přítomnosti určujících aminokyselin v okolí fosforylovaného místa. CHK2 rozpoznává konsensní motiv, kde se v pozici -3 nachází arginin a v pozici -5 je obsažena hydrofobní aminokyselina (Seo, Kim et al. 2003).

Nejvíce prostudovanou dráhou, 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 tumorogeneze. 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 (Obr. 3). Obě kinázy katalyzují fosforylaci částečně se překrývajícího spektra proteinů, takže se signál dále amplifikuje.



Obr. 3. V reakci na poškození DNA dvouřetězcovými zlomy je aktivována ATM kináza, která fosforyluje a aktivuje CHK2, který následně fosforyluje řadu svých substrátů účastnících se zejména regulace buněčného cyklu, reparačních procesů DNA a apoptózy. (podle Stolarova et al. 2020)

Jedním z prvních popsaných substrátů 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, který jej ubiquitinyluje 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. Prvotní analýzy tento fenotyp sice potvrdily, avšak následné studie při endogenní produkci CHK2 zastavení buněčného cyklu nepozorovaly (Jack, Woo et al. 2002). Zastavení buněčného cyklu lze pozorovat i u nádorové linie buněk HCT116, v níž byla kináza CHK2 cíleně deaktivována (Jallepalli, Lengauer et al. 2003).

Na transkripční úrovni je aktivita p21 regulována také pomocí proteinu KAP1 (KRAB (Krüppel-Associated Box Domain)-Associated Protein 1), což je transkripční korepresor skupiny transkripčních faktorů motivu zinkového prstu obsahujících KRAB doménu (Shaltiel, Aprelia et al. 2014). Při poškození DNA působením ionizačního záření či etoposidu je KAP1 fosforylován buďto přímo kinázou ATM na Ser824 nebo pomocí CHK2 na Ser473 (Hu, Zhang et al. 2012). Ser473 KAP1 fosforyluje i kináza CHK1, u které ale dominuje aktivita po UV záření. Fosforylovaný KAP1 není po ozáření schopen reprimovat transkripci a dochází ke zvýšené expresi p21 a zastavení buněčného cyklu na G2/M přechodu (Lee, Goodarzi et al. 2012). Ser473 KAP1 se nalézá v blízkosti vazebného místa pro protein HP1 (Heterochromatin Protein 1), jenž se účastní tvorby a udržování heterochromatinu, pro což je vazba s KAP1 důležitá. Fosforylace tohoto zbytku kinázou CHK2 znemožní tuto vazbu a naruší asociaci KAP1 s regulačními oblastmi a represí transkripce (Chang, Chou et al. 2008). Ser473 ve fosforylované formě taktéž poskytuje vazebné místo pro transkripční faktor E2F1 účastnící se regulace buněčného cyklu a apoptózy. Vazba E2F1 s KAP1 pSer473 snižuje expresi proapoptotických genů pod účinkem E2F1 (Hu, Zhang et al. 2012). Provázanost drah podtrhuje fakt, že E2F1 je fosforylován i kinázou CHK2 na Ser364, což zvyšuje jeho stabilitu a vyústuje v transkripční aktivitu směrem k apoptóze, v tomto případě nezávisle na p53 (Stevens, Smith et al. 2003). Nejspíše je takto v buňce zajištěn regulační zpětnovazebný mechanismus, kdy skrze fosforylaci KAP1 CHK2 kontruje proapoptotickou aktivitu vyvolanou fosforylací E2F1.

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, kterou fosforyluje na Ser123, což znemožňuje fosfatáze defosforylovat komplex CDK2 s cyklinem E (Falck, Mailand et al. 2001). CHK2 je schopná fosforylovat i další fosfatázu – CDC25C a to na Ser216, čímž vytváří vazebné místo pro proteiny 14-3-3, které sekvestrují CDC25C v cytoplazmě a znemožňují jí tak defosforylaci komplexu CDK1 s cyklinem B před vstupem do mitózy (Peng, Graves et al. 1997).

Mimo zmíněné proteiny regulace buněčného cyklu, směřuje kináza CHK2 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). Existují studie, které fosforylaci Ser988 pozorovaly při poškození mitotického vřeténka, kdy docházelo k akumulaci BRCA1 a následné inhibici nukleární aktivity centrozomálních mikrotubulů (Sankaran, Starita et al. 2005, Chabalier-Taste, Racca et al. 2008, Stolz, Ertych et al. 2011). V rámci mitózy byly identifikovány další proteiny účastnící se dráhy oprav DNA (Petsalaki and Zachos 2020). CHK2 neovlivňuje pouze funkci BRCA1, ale taktéž reguluje další proteiny mitotického vřeténka - fosforyluje Thr288 MPS1 (Monopolar Spindle 1), Ser331 AURKB (Aurora Kinase B) nebo Ser507 v MYPT1 (Myosin Phosphatase-Targeting Subunit 1) (Yeh, Yu et al. 2014, Nai, Shi et al. 2019).

Nízká hladina kyslíku – hypoxie nebo zvýšení koncentrace volných kyslíkových radikálů (ROS) mohou taktéž spouštět aktivitu kinázy ATM a CHK2. Důležitým proteinem v tomto případě je Beclin1, jenž chrání buňku před produkcí a poškozením ROS pomocí autofagie a odstraňováním poškozených mitochondrií. Kináza CHK2 fosforyluje Beclin1 na Ser90 a Ser93, čímž narušuje tvorbu regulačního komplexu autofagie Beclin1 s proteinem Bcl2 a chrání tak buňku vystavenou ischemickému poškození (Guo, Wang et al. 2020). Krom přímé interakce s efektorovými proteiny, CHK2 taktéž fosforyluje transkripční faktory FOXK1 a FOXK2 (Forkhead Transcription Factors 1/2), které za normálního stavu buňky reprimují transkripci autofagických genů. Fosforylace kinázou CHK2 v odpovědi na DNA poškození

vytvoří vazebné místo pro proteiny 14-3-3 a FOXK faktory zůstanou sekvestrovány v cytoplazmě, což jim znemožňuje represi autofagie (Chen, Wu et al. 2020).

CHK2 sdílí řadu substrátů i s CHK1, hlavním obecným rozdílem zůstává podnět, kterým jsou jednotlivé dráhy spuštěny – CHK2 je aktivována kinázou ATM v reakci na dvouřetězcové poškození DNA, zatímco CHK1 je fosforylována ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related) v odpovědi na přítomnost dlouhých jednořetězcových úseků DNA. Na rozdíl od kinázy CHK1, jejíž deplece je v zárodečných buňkách letální, CHK2 není pro buňku nezbytný. Experimenty u myši s deplecí *Chk2* (*Chk2*^{-/-}) prokázaly, že myši jsou životaschopné a fertillní, oproti wild-type myším (*Chk2*^{+/+}) však vykazují mírně zvýšený výskyt nádorů a nejsou dostatečně senzitivní k ionizačnímu záření (Takai, Naka et al. 2002). *Chk2*^{-/-} myši mají taktéž častější výskyt infarktů a mozkových mrtvic v závislosti na *Chk2* v dráze indukující autofagii buněk vystavených patologickým podmínkám poškozené tkáně reaktivními kyslíkovými radikály (Guo, Wang et al. 2020).

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). U bělochů v Evropě frekvence *CHEK2* mutací klesá ve směru od severu k jihu, kdy výskyt c.1100delC je ve Velké Británii a Nizozemí v obecné populaci 1 %, zatímco v oblasti Středomoří se tato mutace objevuje spíše zřídka (Caligo, Agata et al. 2004, Kleibl, Novotny et al. 2005, Fachal, Santamarina et al. 2013). Další ze známých a velmi studovaných variant p.I157T dosahuje frekvence 5 % v Maďarsku, Lotyšsku a Polsku a klesá na 2 % v případě Čechů, Slováků a Němců. U čínských pacientů s karcinomem prsu byly hereditární patogenní varianty v *CHEK2* identifikovány pouze v 0,3 % případů (Sun, Meng et al. 2017). V USA, v souboru téměř 7000 pacientů s hereditární formou karcinomu prsu nebo ovaria byl *CHEK2* identifikován jako třetí nejčastěji mutovaný gen po *BRCA1* a *BRCA2*, přičemž frekvence výskytu mutací převládala u bělochů oproti černochoům v obou typech nádorů (Kurian, Gong et al. 2011).

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*. V případě varianty c.1100delC mají nosiči horší

prognózu onemocnění. Z dosavadních studií vyplývá, že patogenní mutace *CHEK2* riziko vzniku karcinomu prsu výrazně zvyšují, pokud je v rodině nosiče pozitivní nádorová anamnéza, u nosičů patogenní mutace c.1100delC se riziko zvyšuje z 20 % až na 40 % (Cybulski, Wokolorczyk et al. 2011, Nurmi, Muranen et al. 2019). Naprostá většina hereditárních mutací *CHEK2* je asociována s estrogen pozitivním typem karcinomu prsu (Cybulski, Huzarski et al. 2009, Hauke, Horvath et al. 2018, Kleiblova, Stolarova et al. 2019) Naopak, analýza hereditárních mutací v 17 genech u 1824 triple negativních pacientů s karcinomem prsu, ukázala, že nosičky patogenních mutací v *CHEK2* se u pacientek bez exprese estrogeního/progesteronového a HER2/Neu receptoru prakticky nevyskytují (Couch, Hart et al. 2015). BCAC konsorcium (The Breast Cancer Association Consortium) ze své analýzy britské populace odhaduje, že kumulativní riziko vzniku ER+ a ER- karcinomu prsu je pro nosiče c.1100delC do 80 let věku 20 % a 3 %, v porovnání s obecnou populací kde jsou rizika 9 % a 2 % (Schmidt, Hogervorst et al. 2016). Přestože obecně u neselektovaných pacientů s karcinomem prsu mají ER+ nádory lepší prognózu, u nosičů hereditárních mutací *CHEK2* je tomu naopak a zvýšené riziko vzniku ER+ karcinomu prsu je spojeno s rozvojem oboustranného nádoru a negativní prognózou (Meyer, Dork et al. 2007, Schmidt, Hogervorst et al. 2016). Častá varianta p.I157T byla v několika analýzách asociována s lobulárním typem karcinomu prsu (Huzarski, Cybulski et al. 2005, Kleiblova, Stolarova et al. 2019).

CHEK2 není pro přežití buňky nezbytný, a s ohledem na četnost hereditárních mutací v dané populaci, lze identifikovat i recesivní homozygoty. Ve studii zaměřené pouze na nosiče mutací v *CHEK2* bylo u 2508 lidí identifikováno 32 (1,3 %) homozygotů, nejčastějšími variantami byly c.1100delC a p.I157T a jejich nosiči byli v 66 % a 60 % diagnostikováni s karcinomem prsu (Sutcliffe, Stettner et al. 2020). Oproti nosičům monoalelické varianty, bialelické mutace znamenají až dvakrát vyšší riziko vzniku karcinomu prsu, pravděpodobněji do 50 let věku a častější výskyt druhého nádoru (Rainville, Hatcher et al. 2020). Dle současných NCCN (National Comprehensive Cancer Network) doporučení by měli nosiči patogenní *CHEK2* mutace od 40 let věku podstupovat pravidelné roční mamografické vyšetření.

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). Mutace v *CHEK2* byly identifikovány u sporadické i dědičné formy karcinomu prostaty přibližně ve stejném procentu (3,75 % a 3,69 %) (Dong, Wang et al. 2003). *CHEK2* se vedle *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *FANCM*, *TP53* řadí do skupiny genů podílejících se

na DNA reparačních drahách, a právě mutace v těchto genech jsou nejčastějšími jak u metastazujících nádorů, tak i u neselektovaných pacientů, ale jejich přítomnost se pojí s vyšším rizikem pokročilejších nádorů. U trunkační mutace c.1100delC *CHEK2* nebyl prokázán vliv na nástup onemocnění, ale má vyšší pravděpodobnost rozvoje letálního onemocnění než lehčí formy (1,28 % oproti 0,16 %) (Wu, Yu et al. 2018). Toto tvrzení nebylo potvrzeno v práci Yadav a kolegů, shodují se však na tom, že celkově mutace v genech reparačních drah byly mnohem četnější u pacientů s metastazující formou onemocnění (Yadav, Hu et al. 2020). Jelikož patogenní mutace v *CHEK2* pravděpodobně predisponují ke vzniku a rozvoji karcinomu prostaty, je jejich nosičům doporučován pravidelný screening a nad 40 let test PSA s roční frekvencí.

3 Metody

Metody využívané v dizertační práci jsou detailně popsány v metodických sekcích v jednotlivých článcích (Kapitola 5). Následující přehled zohledňuje metody, které jsem zpracovávala samostatně (pokud není uvedeno jinak).

3.1 Izolace genetického materiálu

Pro izolaci genetického materiálu bylo použito 10 ml nesrážlivé periferní krve. Pro izolaci genomové DNA byl použit kit Wizard Genomic DNA Purification System (Promega) dle instrukcí výrobce. RNA z čerstvé nesrážlivé krve byla izolována z leukocytů pomocí centrifugace systémem Histopaque 1070 (Sigma) a následně pomocí fenol-chloroformové extrakce s guanidiniumizothiokyanátem (Chomczynski and Sacchi 1987). Alternativně byla izolace RNA provedena systémem PAX gene (Qiagen) dle návodu výrobce. RNA pak byla uchovávána v -80°C .

3.2 Sekvenování nové generace

Pro NGS sekvenování jsme použili 500 ng genomové DNA, kterou jsme rozpustili v TE pufru a následně štěpili na fragmenty o přibližné velikosti 200 bp. Primárně byla použita fragmentace pomocí ultrazvuku (Covaris E220, Covaris Inc.). Alternativním přístupem bylo enzymatické štěpení fragmentázou (KAPA Biosystems) 25 minut při 37°C . Knihovny vzorků byly připraveny pomocí KAPA HTP Library Preparation kitu v případě fragmentace sonikací, nebo pro vzorky štěpené enzymaticky kitem KAPA HyperPlus, dle instrukcí výrobce (KAPA Biosystems, Roche). Univerzální adaptory, indexovací primery pro LM-PCR (Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction) a primery pro poslední PCR po inkubaci se sondami byly navrženy v naší laboratoři. Po výběru fragmentů požadované velikosti 200 bp, byly na jejich konce pomocí ligační PCR (LM-PCR) v 6 cyklech připojeny unikátní indexy, které nám umožňují analyzovat vzorky jednotlivých pacientů dohromady. Spojovalo se vždy 30 vzorků (33 ng každého), abychom dosáhli pokrytí (coverage) sekvenačních cílů $100\times$. Vzorek se následně inkuboval 16-72 h s hybridizačními sondami sekvenačního panelu CZECANCA nebo CZMELAC (NimbleGen Seq-Cap EZ Choice, Roche). Po inkubaci byla knihovna vzorků amplifikována pomocí poslední PCR v 11 cyklech pro dosažení optimální výsledné koncentrace 2 ng/ μl . Velikost a kvalita fragmentů byly v průběhu přípravy kontrolovány

pomocí mikrofluidní elektroforézy (Agilent 2100, Agilent) po kroku fragmentace, selekce velikosti, amplifikaci pomocí LM-PCR a výsledné knihovny. Výsledná knihovna vzorků o koncentraci 18 pM byla sekvenována na přístroji MiSeq za použití sekvenační chemie MiSeq Reagent Kit v3, 150 cyklů (Illumina).

Velké genové přestavby v genu *CHEK2* byly detekovány/konfirmovány z NGS analýz metodou MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification), kit P190 (MRC-Holland) dle instrukcí výrobce.

3.3 Bioinformatická analýza

Sekvenační data získaná sekvenátorem MiSeq byla zpracována Mgr. Petrou Zemánkovou, PhD. v naší laboratoři postupem, který nyní používá pro přípravu databáze CZECANCA. Soubory ve formátu FASTQ jsou mapovány programem Novoalign na referenční genom hg19. Vzniklé SAM (Sequence Alignment Map) a jejich binární forma - BAM soubory jsou zpracovány do VCF (Variant Call Format) souboru, jenž obsahuje informaci pouze o variantních nukleotidech. Kvalita VCF souborů je provedena pomocí GATK postupu (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) a následně jsou anotovány za použití SnpEff (Cingolani, Platts et al. 2012). Inzerce a duplikace nad velikost 35 bp, jsou identifikovány nástrojem Pindel (<http://gmt.genome.wustl.edu/packages/pindel/>). Velké genové přestavby jsou detekovány pomocí CNVkit (<https://pypi.python.org/pypi/CNVkit>).

Pro hodnocení genotypů a prioritizaci identifikovaných variant byly využity údaje veřejných databází genotypů (gnomAD, 1000 genomes project, FLOSSIES), výsledky sekvenování kontrolních vzorků (nenádorová populace osob starších 60 let bez onkologických onemocnění u přímých příbuzných – tzv. superkontroly), databáze klinických interpretací variant (ClinVar, OMIM).

Identickým bioinformatickým postupem byly zpracovány i sekvenační běhy analyzované pomocí panelu CZMELAC u pacientů s melanomem. Pro pacienty s melanomem sloužily jako kontroly genotypy získané z exomového sekvenování (WES) poskytnuté laskavostí prof. Ing. Stanislava Kmocha, CSc. a Mgr. Viktora Stráneckého, Ph.D. z Národního centra lékařské genomiky (www.ncmg.cz).

3.4 Funkční analýzy variant nejasného významu

Naší první metodou pro charakteristiku enzymatické aktivity identifikovaných sekvenčních variant genu *CHEK2* byla komerční analýza založená na schopnosti variantních kináz fosforylovat arteficiální substrát s navázaným fluoroforem. Plazmidy pDREAM2.1-*CHEK2* nesoucí buďto wild-type nebo mutantní variantu byly transformovány do bakteriálního kmene *E. coli* BL21. Exprese proteinu byla indukována 50 μ M IPTG při $OD_{600}=0,5$, následně byly buňky sklizeny centrifugací a lyzovány pomocí cOmplete Lysis-B kit (Roche). Enzymová aktivita jednotlivých variant *CHK2* byla měřena v 1 μ g celkového bakteriálního lyzátu pomocí Omnia S/T Peptide 3 Kinase assay kit (Life Technologies) dle protokolu výrobce. Specifický substrát s navázaným fluoroforem Sox po fosforylaci kinázou zvýšil svou fluorescenci, která byla detekována v intervalu 90 s po dobu 1 h pomocí přístroje FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG Labtech). Aktivita wild-type *CHK2* byla považována za 100% a hodnoty aktivit variantních kináz k ní byly normalizovány.

Pro další analýzy jsme zvolili modelový systém netransformované buněčné linie odvozené od lidských buněk sítnicového epitelu hTERT-RPE1 (ATCC CRL-4000), ve které byl CRISPR/Cas9 přístupem vytvořen knockout genu *CHEK2*. Do těchto buněk jsme transientně transfekovali plazmidy pcDNA4-EGFP-FLAG-*CHEK2* s variantními kinázami a měřili jsme jejich schopnost fosforylovat endogenní substrát Ser473 KAP1. V odpovědi na poškození DNA ionizačním zářením, neokarcinostatinem nebo etoposidem je KAP1 fosforylován kinázou *CHK2* specificky na Ser473. Zjistili jsme, že při exogenní expresi *CHK2* dochází k jeho dostatečné aktivaci pro fosforylaci Ser473 i bez dalšího podnětu a na tomto poznání jsme se rozhodli založit naši analýzu.

Krom oblasti aktivační smyčky (aminokyseliny 371 – 391) je kináza *CHK2* autofosforylována na Ser516. Proti této fosforylaci existuje primární protilátka doporučena pro western blot, kde lze mezi nespecifickým signálem detekovat tuto fosforylaci u parentálních RPE1 buněk po jejich ozáření. Podařilo se nám tuto protilátku využít pro imunofluorescenční mikroskopii, jelikož po transientní transfekci poskytovala specifický signál u aktivní wild-type varianty *CHK2* oproti neaktivní kontrole, a proto jsme se jí rozhodli použít v naší analýze jako další výstup.

Buňky RPE1-*CHEK2*-KO, rostoucí na krycích sklíčkách, jsme transfekovali plazmidem nesoucím jednotlivé studované varianty *CHK2* kinázy, kontrolami byla wild-type kináza, zkrácená a nefunkční varianta c.1100delC a prázdný EGFP plazmid. Den po transfekci jsme

buňky fixovali 4% paraformaldehydem, permeabilizovali použitím 0,2% Triton X-100 v PBS a blokovali v 3% BSA v PBS. Následně byla sklíčka inkubována v primární protilátce KAP1 pSer473 (BioLegend) nebo CHK2 pSer516 (Cell Signaling), poté se sekundární protilátkou Alexa568 a DAPI. Po omytí a usušení byla sklíčka připevněna na podložní sklíčko za použití Vectashield H-1000 a signál byl snímán pomocí mikroskopu ScanR (Olympus) objektivem 40×/1,3 NA. Mikroskopická data byla vyhodnocena v programu ScanR Analysis Software (Olympus). Schopnost jednotlivých variantních kináz fosforylovat substrát Ser473 KAP1 nebo se autofosforylovat (Ser516 CHK2) jsme normalizovali k wild-type kináze CHK2.

4 Seznam publikací

4.1 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 Leeneer 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, Cervenkova 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

4.2 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, Červenkova J, Schneiderová M, Burócziová M, Burdová K, Stránecký V, Foretova 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.

4.3 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, Bielicikova Z, Tesarova P, Petruzelka 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, Argalacsova 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

5 Komentář k vybraným publikovaným pracím

5.1 **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.

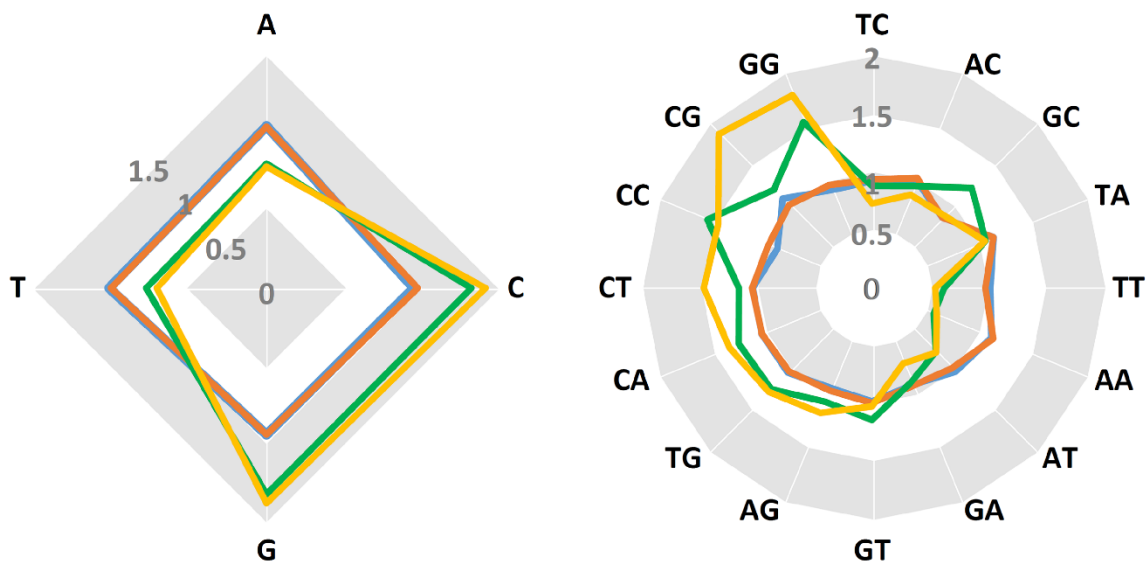
Moderní technologie masivního paralelního sekvenování nové generace dnes plně nahradila přístup analýzy mutací postupně po jednotlivých genech. Spektrum genů v prvním použitém sekvenačním panelu bylo naddimenzované a obsahovalo mnoho genů bez možnosti klinické interpretace (Lhota, Zemankova et al. 2016). Proto jsme se rozhodli vytvořit panel CZE CANCA cílící geny, které mají souvislost s nádorovými syndromy, a který by byl využitelný pro klinickou diagnostiku nádorové predispozice. Paralelní zpracování velkého množství vzorků umožní zrychlení laboratorní diagnostiky, a rozšíření panelu do dalších laboratoří přispěje k unifikaci diagnostiky nádorové predispozice v ČR. Před uvedením do laboratorní praxe a klinické diagnostiky bylo nezbytné určit senzitivitu, specifickou a přesnost analýzy panelem CZE CANCA - důkladně otestovat a demonstrovat robustnost analýz v rámci jednoho sekvenačního běhu, mezi více analýzami i při zpracování identických vzorků v rámci jedné i mezi několika laboratořemi. 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 delecii či inzerci, 217 bylo testováno negativně a 35 vzorků obsahovalo dříve charakterizované intragenové přestavby.

Pro přípravu knihovny vzorků byla použita DNA izolována z leukocytů periferní krve, která byla nejprve fragmentována na velikost přibližně 200 bp. V přípravě knihoven jsme lepší uniformity dosáhli fragmentací ultrazvukem (ultrasonikátor Covaris E220, Covaris Inc)

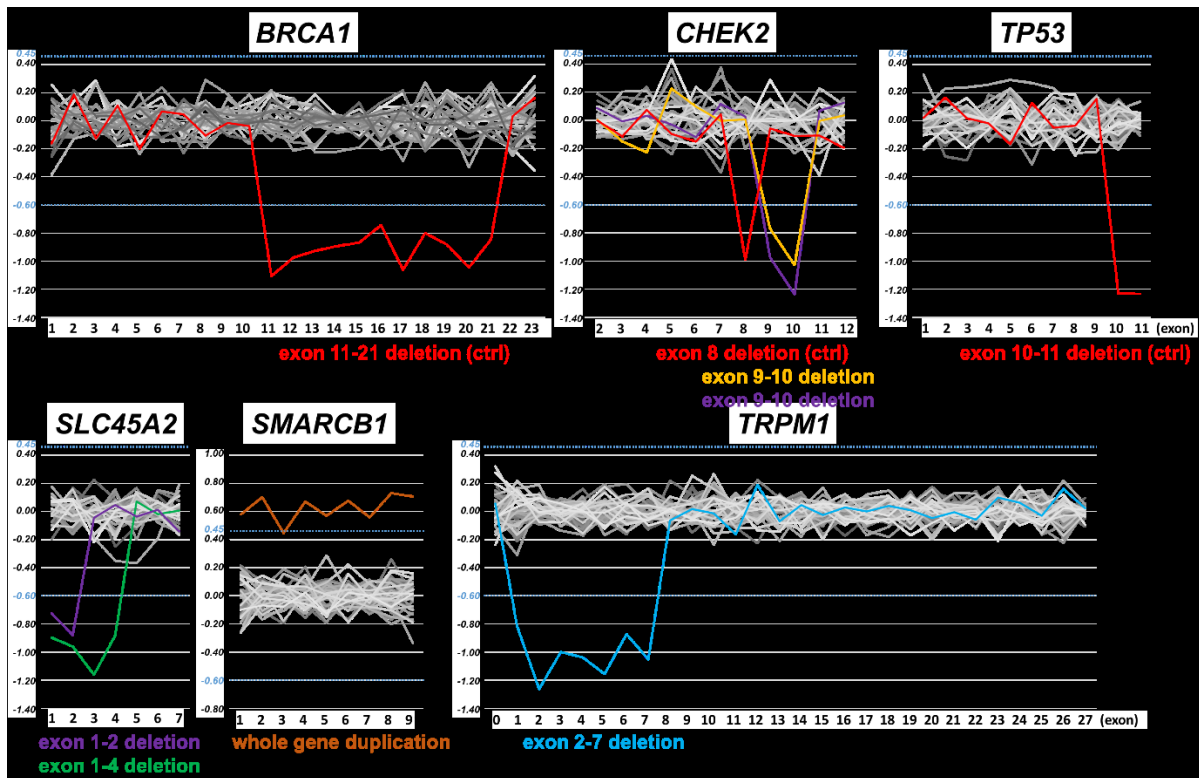
ve srovnání s enzymatickým štěpením fragmentázou (KAPA Biosystems, Roche; Obr. 4). Důvodem byla preferenční fragmentace G/C-bohatých oblastí DNA.



Obr. 4 Mezilaboratorní porovnání relativního zastoupení (poměru) terminálních 3' nukleotidů (vlevo) a dinukleotidů (vpravo) při fragmentaci DNA ukazuje vyrovnané zastoupení v laboratořích používajících mechanickou fragmentaci DNA (modrá a červená linka) a posun k vyššímu zastoupení C/G v porovnání s A/T v laboratořích využívajících enzymovou fragmentaci.

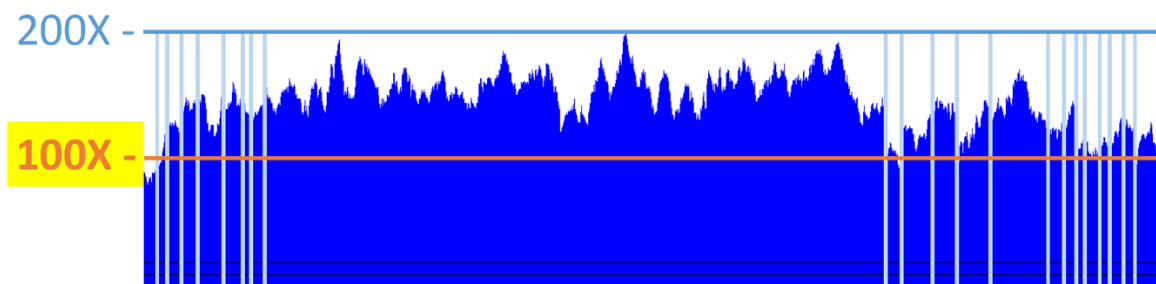
Aby bylo možné analyzovat paralelně vyšší počet vzorků dohromady, bylo nutné označit fragmenty DNA od jednotlivých pacientů unikátními DNA identifikátory (tzv. barkódy) pomocí ligační PCR (Ligation-Mediated PCR, LM PCR) v 5 cyklech. Pro inkubaci s hybridizačními sondami pro nabohacení cílových sekvencí 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 rekalibrace 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 zpracována pomocí CNVkit (Obr. 5). 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. 6).



Obr. 5. Vizualizace intragenových přestaveb v genech *BRCA1*, *CHEK2* a *TP53* hodnocených pomocí CNV kitu. Hodnota <-0.6 znamená přítomnost delecce, hodnota >0.5 znamená přítomnost duplikace. Jednotlivé alterace jsou popsány pro znázorněné geny pod grafem a barevně odlišeny.

Analýza prokázala velmi dobré a homogenní pokrytí většiny cílených genů: více než 85 % cílových sekvencí pokryto 100×, 98 % cílů bylo pokryto alespoň 50× a pouze 0,2 % cílové oblasti byla pokryta méně než 20×. Málo pokryté oblasti jsme pozorovali opakovaně u 12 stejných genů, kdy se jednalo buďto o absenci sond pro daný úsek (z důvodů výskytu pseudogenů či repetitivních oblastí), vysoké zastoupení GC nukleotidů (nekvalitně pokryté oblasti vykazovaly obsah GC přes 76 %, zatímco průměrný cíl panelu měl 47 %).



Obr. 6. Vizualizace pokrytí genu *BRCA1* v programu Boudalyzer při rutinní analýze cílcí na průměrné pokrytí 100× ukazující velmi homogenní pokrytí všech 22 exonů (oddělených světle modrými úsečkami)

Pro vyhodnocení správnosti analýzy jsme použili analýzu pěti vzorků od Coriell Institute for Medical Research, pro které jsou dostupné BAM soubory ze sekvenování na různých sekvenačních platformách a genotypy analyzovaných DNA standardů.

Validačními nástroji se nám podařilo prokázat, že analýza panelem CZEKANCA 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 CZEKANCA je důležitým předpokladem pro tvorbu frekvenční databáze hereditárních variant u rizikových pacientů.

Na této studii jsem se podílela optimalizací NGS analýz, přípravou vzorků a tvorbou sekvenačních knihoven. Analyzovala jsem získaná sekvenační data a potvrdila nálezy.

5.2 **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 Leeneer 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.

Při přípravě panelu CZECANCA jsme do cílové sekvence zahrnuli i promotorové oblasti vybraných genů s vysokou penetrancí, včetně genu *BRCA1*, který je dominantním nádorovým predispozičním genem pro vznik dědičné formy karcinomu prsu v naší populaci a *BRCA2*, jehož dědičné varianty jsou druhou nejčastější příčinou tohoto onemocnění. Ve spojení s karcinomem prsu byly publikovány studie, které identifikovaly varianty mající vliv na funkci promotoru a riziko onemocnění se rovnalo variantám v kódujících oblastech (Michailidou, Lindstrom et al. 2017). V promotorové oblasti jsme následně identifikovali řadu variant, především jednonukleotidových záměn, jejichž klinický význam není znám. Bez zjevného klinického významu jsou i delece v oblasti promotoru a prvních nekódujících exonů alternativních transkripčních variant *BRCA1* 1A a 1B.

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 anamnézou 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 (**Obr. 7**).

Celkem bylo identifikováno 141 raritních variant promotorů, 76 zcela nově. Kolegové z konsorcia ENIGMA provedli sérii *in silico* analýz a prioritizovali 21 variant (9 variant promotoru *BRCA1* a 12 variant promotoru *BRCA2*), které mohou mít vliv na regulaci transkripce a asociaci s DNA-vazebnými doménami transkripčních faktorů, a tyto varianty byly podrobeny dalším analýzám.

Čtyři varianty (*BRCA1*:c.-315del, *BRCA1*:c.-287C>T, *BRCA1*:c.-192T>C, a *BRCA2*:c.-296C>T) vykazovaly pozměněnou aktivitu promotoru v luciferázové eseji v buňkách linií MCF-7 a MDA-MB-231 oproti wild-type variantám. *In silico* predikční program tyto varianty

lokalizovaly do míst vazby transkripčních faktorů, které se kvůli modifikaci konsensního vazebného místa mohou přestat vázat. Výsledky retardační analýzy (Electrophoretic Mobility Shift Assay; EMSA) u tří z těchto variant (*BRCA1*:c.-315del, *BRCA1*: c.-287C>T, a *BRCA2*:c.-296C>T), prokázaly vliv na vazbu transkripčního faktoru NFYA na CCAAT-box v promotoru *BRCA1* 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.

Location	Institution	Samples	Gene region
Paris	Institut Curie, Saint Cloud	686 cases	<i>BRCA1</i> 5' region, <i>BRCA2</i> 5' region
Milan	IFOM, Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare	772 cases 661 controls	<i>BRCA1</i> 5' region
Pisa	Department of Translational Research and New Technologies in Medicine, University of Pisa	80 cases	<i>BRCA1</i> 5' region, <i>BRCA2</i> 5' region
Santiago de Compostela	Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica-SERGAS, Grupo de Medicina Xenómica-USC, CIBERER, IDIS	270 cases 130 controls	<i>BRCA1</i> 5' region, <i>BRCA2</i> 5' region
Copenhagen	Center for Genomic Medicine	1157 cases	<i>BRCA1</i> 5' region, <i>BRCA2</i> 5' region
Ghent	Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital	357 cases	<i>BRCA1</i> 5' region, <i>BRCA2</i> 5' region
Barcelona	Vall d'Hebron Institute of Oncology	192 cases	<i>BRCA1</i> 5' region, <i>BRCA2</i> 5' region
Prague	CZECANCA – CZEch CAncer panel for Clinical Application, Institute of Biochemistry and Experimental Oncology	2961 cases 312 controls	<i>BRCA1</i> 5' region, <i>BRCA2</i> 5' region
Maastricht	Department of Clinical Genetics, Maastricht University Medical Centre	900 cases	<i>BRCA2</i> 5' region

Obr. 7. Přehled vzorků zařazených do analýzy promotorových variant genů *BRCA1* a *BRCA2* ukazující příspěvek vzorků z naší laboratoře analyzovaných pomocí panelu CZECANCA.

Doporučené hodnocení promotorových variant dle konsorcia ENIGMA je kalibrováno pro klasifikaci vysoce rizikových variant založené na populační frekvenci a klinických datech. Podle této klasifikace, námi identifikované varianty nepředstavují pro nosiče vysoké riziko vzniku karcinomu prsu. Přestože námi identifikované varianty se neřadí mezi vysoce rizikové a nebudou mít zásadní klinický význam ve smyslu zvýšeného rizika vzniku nádorových onemocnění charakterizujících dědičně podmíněné karcinomy prsu a/nebo ovaria, mají funkční vliv na regulaci genové exprese a pro zhodnocení nízkého až středního rizika jsou nutné další studie.

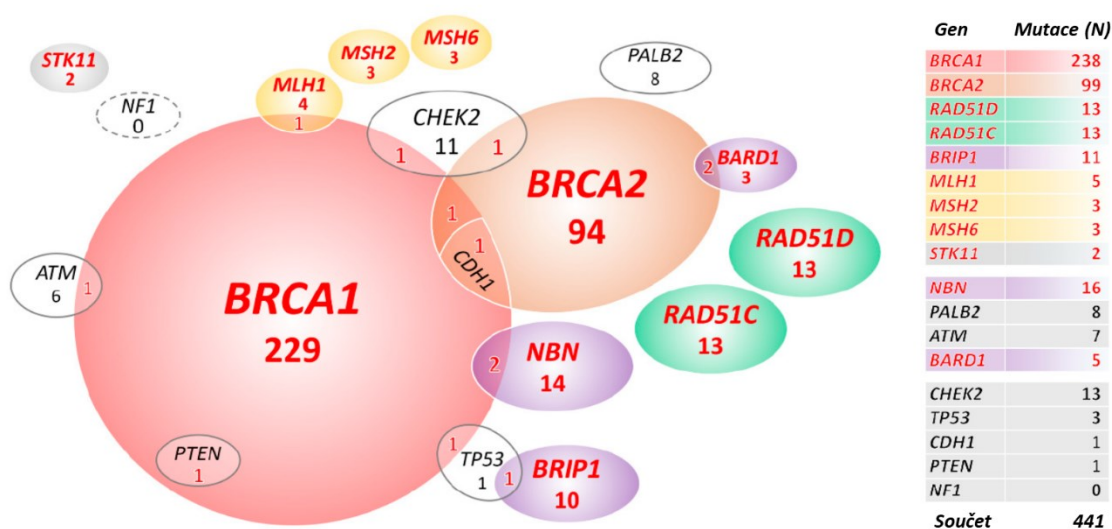
V této práci bylo mým podílem zpracování většiny vzorků NGS pacientů a kontrol.

5.3 **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 této studii jsme se zaměřili na systematický popis dědičné nádorové predispozice u patientek s karcinomem ovaria v ČR s charakterizací predispozičních genů, identifikací rizikových osob a analýzou klinickopatologických charakteristik. Pomocí sekvenačního panelu CZECANCA analyzovali 1333 patientek s karcinomem ovaria. Výskyt germinálních alterací u patientek byl porovnáván s prevalencí těchto variant v souboru 2278 kontrol.

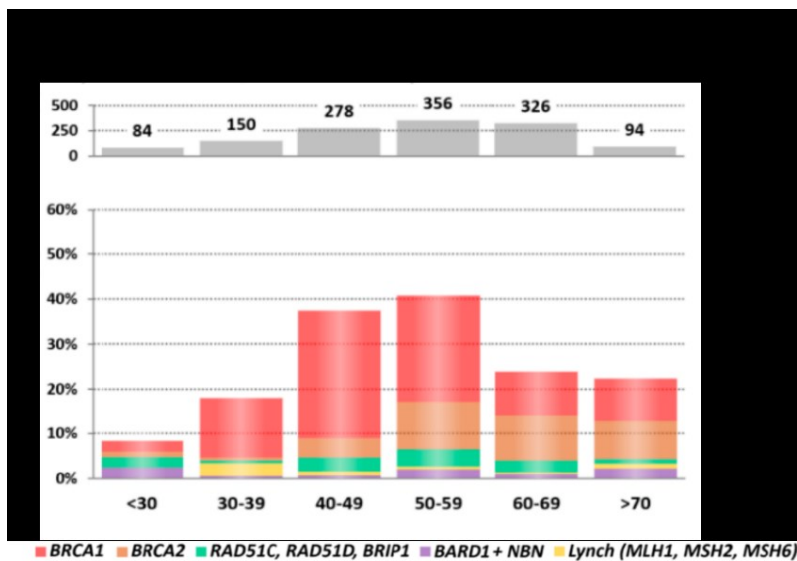
Primárně jsme se zaměřili na hodnocení 18 predispozičních genů ke karcinomu prsu a ovaria uvedených v NCCN doporučeních, která jsou podkladem pro národní doporučení (Foretova, Navratilova et al. 2019). V těchto genech jsme identifikovali 441 mutací u 427/1333 (32 %) patientek a 58/2278 (2,5 %) kontrol (**Obr. 8**).



Obr. 8. U 427 nosičů jsme identifikovali 441 mutací v 18 známých predispozičních genech. Červeně značeny jsou geny a počty mutací v genech, které v naší studii významně zvyšovaly riziko karcinomu ovaria. Třináct nosičů mělo více než jednu mutaci.

CNV analýzy u těchto 18 genů odhalily přítomnost 37 velkých intragenových přestaveb u 37/1333 (2,8 %) pacientek, což představuje 8,4 % (37/441) všech identifikovaných patogenních variant. Přestavby byly zaznamenány u sedmi genů – 23 přestaveb v *BRCA1*, čtyři v *BRIP1*, čtyři v *CHEK2*, dvě v *MLH1*, dvě v *STK11*, jedna v *PALB2* a jedna v *CDH1*. V souboru kontrol byla nalezena pouze jedna duplikace celého genu *MSH6*, která je klasifikována jako VUS.

Nejvyšší frekvenci dědičných mutací jsme našli u pacientek, které byly diagnostikovány ve věku 40-49 a 50-59 (37,4 % a 40,7 %), naopak nejnižší u nejmladších 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 (Obr. 9). Frekvence mutací v ostatních genech byla v těchto věkových skupinách podobná (4,8 % oproti 4,3 %). Nejnižší medián věku diagnózy (46 let) jsme pozorovali u nosičů mutací v genech Lynchova syndromu (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*).



Obr. 9. Zastoupení nosičů identifikovaných mutací v jednotlivých věkových kategoriích. Mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1/2* byly významně více zastoupeny u pacientek nad 70 let než u pacientek mladších 30 let

U pacientek s pozitivní rodinnou anamnézou karcinomu ovaria byla frekvence mutací nejvyšší (49,1 %; 57/116), v případě diagnózy dědičného karcinomu prsu a ovaria 41 % a u pacientek s příbuznými s nádorovými onemocněními v rodině 29,4 %. Proporce mutací v *BRCA1* se v uvedených skupinách postupně snižovala. Nicméně, u 587 pacientek bez pozitivní rodinné anamnézy jsme identifikovali 120 (20,4 %) nosičů patogenních mutací.

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 % pacientek. Mutace v dalších z hlavních predispozičních genů, především *RAD51C/RAD51D/BRIP1*, jsme našli u přibližně 5 % pacientek. 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 pacientek 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 dědičných alterací podmiňujících vznik dědičných karcinomů ovaria. Potvrdily, že dědičná forma vzniká u téměř třetiny pacientek, 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 pacientek. Analýza nádorové predispozice u této skupiny nemocných v současné době probíhá na úrovni celogenomového, exomového a transkriptomového sekvenování.

Mým podílem na této publikaci byla příprava sekvenačních knihoven, analýza sekvenačních běhů, confirmace nálezů a příprava manuskriptu.

5.4 **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, Dunder P, Foretova L, Macurek L, Kleiblova P, Kleibl Z. *Biomedicines*. 2020 Oct 9;8(10):404.

V analýze 264 rizikových pacientů jsme provedli analýzu dědičných variant predisponujících ke vzniku maligního melanomu, nejzávažnějšího kožního nádorového onemocnění, jehož dědičná podstata nebyla doposud v ČR systematicky studována.

Produkty genů, jejichž mutace souvisejí s familiárním maligním melanomem, se účastní několika molekulárních drah – regulace buněčného cyklu, pigmentace, DNA oprav a udržování délky telomer. Hlavním predispozičním vysokopenetrantním genem pro vznik melanomu je *CDKN2A* kódující cyklin-dependentní kinázový inhibitor p16^{INK4} a pozitivní regulátor p53 p14^{ARF}. Mutace v *CDKN2A* v rodinách s maligním melanomem zvyšuje celoživotní riziko vzniku nádoru pankreatu, a je odhadováno na 11 - 17 % (Lindor, McMaster et al. 2008). Varianty v *CDKN2A* mírně zvyšují riziko rozvoje melanomu i u obecné populace.

Pro naši analýzu jsme vytvořili sekvenační panel CZMELAC cílící 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 (Tab. 1). Geny byly vybrány na základě studia prací souvisejících s analýzou hereditárních faktorů maligního melanomu s různou mírou penetrance, včetně populačních (genom-wide; GWAS) studií. Dalším zdrojem kandidátních genů byla databáze Phenopedia.

Analýzu jsme provedli především u vysoce 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.

Analýza pomocí NGS byla provedena podobně jako tomu bylo u panelu CZEKANCA, protože cílové sekvence obou panelů byly velikostně srovnatelné. Analýza sekvenačních dat byla provedena naším bioinformatikem, Mgr. Petrou Zemánkovou, Ph.D., analýza CNV Mgr. Sandrou Jelínkovou.

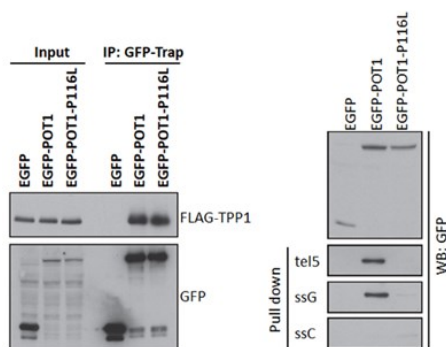
Patogenní či pravděpodobně patogenní (class 4/5) varianty jsme identifikovali u 31/264 (11,7 %) pacientů s melanomem (u 35/1479, tj. 2,3 % kontrol), ve vysoce až středně rizikových genech u devíti (3,4 %) pacientů a u 22 pacientů (8,3 %) v genech predisponujícím k jiným nádorovým onemocněním. Dle předpokladu, ve skupině vysoce až středně rizikových genů byly nejčastěji zastoupeny mutace v genu *CDKN2A* a to u šesti pacientů. Dle databáze ClinVar se jednalo o patogenní varianty – dvě missense varianty (p.R24P a p.R112G), dvě posunové mutace (p.G6Qfs*7 a p.Y129Hfs*11), in-frame delece zkracující C-koncovou část proteinu (p.L32_L37del) a varianta ovlivňující sestřih (r.384_457del74). Všichni tito pacienti měli v rodině příbuzného s nádorovým onemocněním, z čehož v pěti případech se jednalo o alespoň jednoho příbuzného s melanomem.

vysoce až středně rizikové predispoziční geny	<i>ACD, BAPI, CDK4, CDKN2A, MTF, POT1, TERF2IP, TERT</i>
nízko rizikové predispoziční geny	<i>AGR3, ARNT, ASIP, CASP8, CCND1, CDKN2B, CLPTMIL, FTO, HERC2, IRF4, MC1R, MGMT, MTAP, MX2, OBFC1, OCA2, PARP1, PLA2G6, SETDB1, SLC24A4, SLC45A2, TERF1, TERF2, TINF2, TYR, TYRP1</i>
geny predisponující k nádorovým onemocněním bez známého vlivu na rozvoj melanomu	<i>APC, ATM, BARD1, BMPRIA, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, FH, CHEK2, KIT, MET, MSH2, MSH3, MSH6, NBN, NF1, NF2, PALB2, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, RAD51C, RAD51D, RB1, RET, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, STK11, TP53, VHL, WRN, WTI</i>
geny spojené s melanomem bez známého vlivu dědičnosti	<i>AURKA, BBC3, BLM, BRAF, BRMS1, CASP10, CBL, CCAR2, CCNH, CDK10, CDK7, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CEBPA, COX8A, CTLA4, CTNNA1, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1, CYP11A1, CYP1A2, CYP3A5, DAB2IP, DCAF4, DDB1, DDB2, EDNRB, EGF, EGFR, EIF1AX, EPCAM, ERBB2, ERBB4, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, EXOC2, EZH2, FANCC, FANCL, FANCM, FAS, FASLG, FGFR2, FGFR4, FLCN, FLT1, FOXP3, GATA2, GATA4, GC, GNA11, GNAQ, GPC3, GSTM1, GSTM3, GSTP1, GSTT1, H2AFY, HRAS, IDH1, IDH2, IFIH1, IFNA1, IFNG, IL10, IL2RA, IL4, IL6, IL8, ING4, KAT6A, KIAA1967, KMT2A, KRAS, LRIG1, MAP2K1, MDM2, MLH1, MLH3, MMP1, MMP3, MUTYH, MYH7B, NCOA6, NFKB1, NFKBIE, NOD2, NOTCH3, NRAS, PAX5, PDGFRA, PIGU, PIK3CA, PIK3R1, PIK3R4, PMAIP1, PMS1, POLH, POMC, PPM1D, PPP6C, PRF1, PTGS2, PTCH1, PTPN11, PTPN22, RAC1, RAD23A, RAD23B, RASEF, RECQL, RECQL4, RHOTB2, RUNX1, SBDS, SF3B1, SH2B3, SLX4, SMARCB1, SNX31, STAG2, STK19, SUZ12, TACC1, TERC, TLR3, TRPM1, TSC1, TSC2, VDR, XAB2, XPA, XPC, XRCC1, XRCC3, ZNF365</i>

Tab. 1. Seznam genů obsažených v sekvenčním panelu CZMELAC (Czech MELAnoma panel for Cancer predisposition) navrženém pomocí programu NimbleDesign (Roche). Primárním cílem byly všechny kódující exony včetně 10 přilehlých intronových bazí, finální velikost cíle byla 563 471 bp.

Dalším ze skupiny klinicky významných genů je *POT1* (Protection of Telomere 1), jehož proteinový produkt se podílí na kontrole délky telomer (Loayza and De Lange 2003, Kibe, Zimmermann et al. 2016). Protein POT1 rozpoznává a interaguje s jednořetězcovými úseky

repetitivních sekvencí telomer 5'-TTAGGG-3'. POT1 rovněž interaguje prostřednictvím TPP1 s proteiny TRF1 a TRF2, které jsou součástí shelterinového komplexu sloužícího jako ochranná vrstva telomerických oblastí (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*. Tato varianta byla již dříve spojena s nádorovým onemocněním (Calvete, Garcia-Pavia et al. 2017). Vlastní funkční charakterizaci provedla Ing. Radka Štorchová v laboratoři školitele konzultanta (ÚMG AVČR). Zda je variantní protein POT1 P116L schopen interagovat s TPP1 jsme analyzovali pomocí imunoprecipitace. Buňky HEK293 byly kotransfekovány plazmidem nesoucím FLAG-TPP1 a buďto EGFP-POT1 wild-type nebo EGFP-POT1-P116L, jako negativní kontrola bylo použito EGFP. Buněčné extrakty pak byly inkubovány s GFP-Trap kuličkami (Chromotek), navázané proteiny poté byly eluovány a analyzovány western blotem (Obr. 10). Nadto jsme zjišťovali, zda varianta ovlivňuje vazbu na telomerickou ssDNA. Opět jsme použili buněčnou linii HEK293, kterou jsme transfekovali EGFP, EGFP-POT1 wild-type nebo EGFP-POT1-P116L, následně jsme buněčné extrakty inkubovali s biotinylovanou telomerickou DNA (ssG a tel5) nebo kontrolní DNA (ssC) a nakonec byly přidány streptavidinové kuličky. Navázané proteiny byly analyzovány pomocí western blotu (Obr 10).

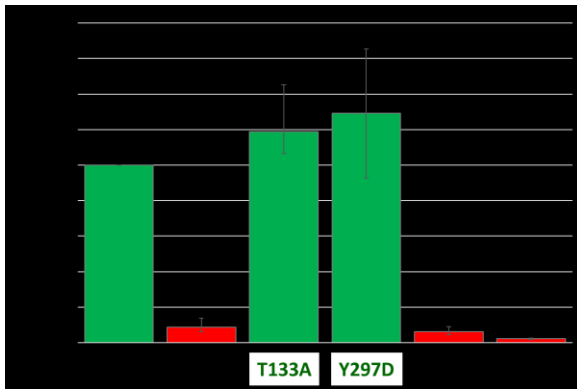


Obr. 10. Funkční analýza p.P116L POT1. Schopnost vazby TPP1 je zachována (vlevo) naopak p.P116L neváže telomerickou ssDNA (vpravo).

Výsledky funkční analýzy prokázaly, že variantní protein p.P116L je schopen normálně interagovat s TPP1 avšak nerozpoznává ssDNA, stejně jako dříve charakterizovaná sousední varianta p.R117C (Calvete, Martinez et al. 2015). Na základě provedených funkčních 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 ani p.Y297D sníženou katalytickou aktivitu (Obr. 11) a tudíž jsme je nepovažovali za patogenní varianty zvyšující riziko vzniku melanomu.



Obr. 11. Výsledky funkční analýzy variant *CHK2*. Aktivita variantních kináz *CHK2* vůči substrátu S473 KAP1 v systému transientní transfekce buněčné linie RPE1-*CHEK2*-KO. Hodnocení aktivity variant v porovnání s wild-type kinázou (WT; 100%) a nefunkční truncační variantou c.1100delC. Prázdný vektor EGFP a netransfekované buňky NT jsou technické negativní kontroly.

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); $P=3,2 \times 10^{-7}$).

Vznik melanomu je značně ovlivněn jinými než hereditárními faktory jako je senzitivita kůže k vystavení UV záření, solární poškození kůže v nízkém věku a přítomnost mateřských znamének. V této práci jsme se však zaměřili na podíl hereditární složky na vzniku onemocnění, a snažili se zmapovat výskyt zárodečných varinat predisponujících pro vznik melanomu u pacientů v rámci populace ČR. Z našich výsledků vyplývá, že melanomové predispoziční geny by měly být součástí panelů NGS pro paralelní vyšetření hereditárních predispozic pro různá nádorová onemocnění pro pomoc identifikace vysoce rizikových jedinců s melanomem.

Mým podílem na této práci byla příprava panelu CZMELAC, výběr části analyzovaných pacientů, jejich NGS analýza, confirmace identifikovaných alterací a CNV a funkční analýza variant *CHEK2* a příprava manuskriptu.

5.5 **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, Cervenkova 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

Dědičné patogenní mutace postihují u pacientek s karcinomem prsu a ovaria nejčastěji geny *BRCA1* a *BRCA2*. Třetím nejčastěji mutovaným genem, především u pacientek s karcinomem prsu pocházejících z germánských a slovanských populací Evropy, je však gen *CHEK2*.

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 genu *CHEK2* znemožňují použití frekvence výskytu v kontrolních souborech uvedených ve veřejně dostupných databázích. Nerespektování populačních specifíků značně zkresluje výpočet relativního rizika vzniku studovaných nádorů pro nosiče mutací v genu *CHEK2*.

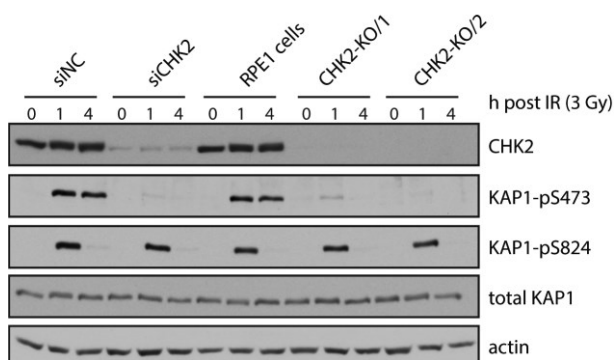
K vyšetření jsme použili panel CZECANCA, avšak jeho původní verze nezahrnovala sondy pro selektivní nabohacení exonů 11 – 14. Jejich sekvence je v lidském genomu přítomna několikrát ve formě pseudogenů s velmi malým rozdílem v primární sekvenci od genu *CHEK2*. Tato část genu se tedy musela vyšetřovat dodatečně pomocí teplotně-denaturační analýzy (HRM) a následného sekvenování vzorků s aberantním profilem tání.

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 immortalizovaných pomocí zvýšené exprese telomerázy (linie hTERT-RPE1). V těchto buňkách jsme přístupem CRISPR/Cas9 vytvořili knockout genu *CHEK2*. Do výsledných buněk RPE1-*CHEK2*-KO jsme

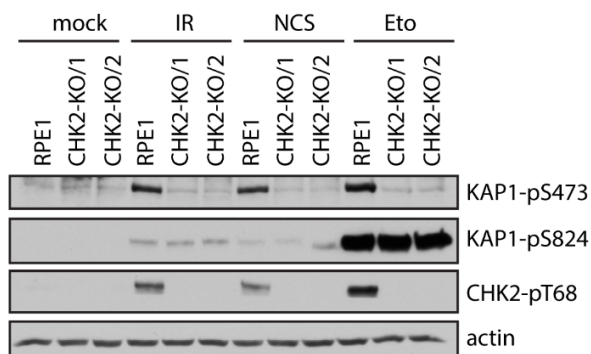
následně transientně transfekovali variantní kinázy spolu s kontrolami (wild-type kináza a prázdný vektor s EGFP) a jejich aktivitu jsme měřili jako schopnost fosforylovat endogenní substrát Ser473 KAP1, což jsme detekovali imunofluorescenčně pomocí ScanR mikroskopu.

Experimentálně jsme ověřili, že linie RPE1-*CHEK2*-KO buněk je vhodným modelovým systémem. Potvrdili jsme, že oba námi vytvořené klony RPE1-*CHEK2*-KO se v odpovědi na ionizační záření chovají stejně jako parentální RPE1 s deplecí *CHK2* za využití siRNA (Obr. 12). V depletovaných buňkách nedochází k fosforylaci Ser473 KAP1, zatímco fosforylace Ser824, která není na *CHK2* závislá, zůstává ve všech buňkách nezměněna.



Obr. 12. Srovnání parentálních RPE1 buněk se dvěma vytvořenými klony RPE1-*CHEK2*-KO buněk v reakci na ionizační záření. Parentální RPE1 buňky byly buďto netransfekovány nebo transfekovány siRNA proti *CHEK2* nebo kontrolní siRNA, spolu s RPE1-*CHEK2*-KO klonem 1 a 2 byly buňky ozářeny 3 Gy a sklizeny po 1 a 4 h. Detekce specifického signálu fosforylace KAP1 byla vyhodnocena pomocí western blotu.

Taktéž jsme zjišťovali, jak velký signál pSer473 vyvolají různé typy poškození způsobující dvouřetězcové zlomy (Obr. 13), a zda by v některém případě v RPE1-*CHEK2*-KO buňkách nemohlo docházet k zastoupení aktivity chybějící *CHK2* jinou kinázou. V parentálních RPE1 bylo patrné, že ve všech případech dochází k aktivaci *CHK2* (pThr68), nejsilnější odpověď vyvolal v buňkách etoposid (dle pS824 KAP1), ale ani po něm ani po ionizačním záření nebo neokarcinostatinu nedošlo k fosforylaci Ser473 v RPE1-*CHEK2*-KO buňkách oproti parentálním. Mohli jsme tedy uvažovat, že fosforylace Ser473 KAP1 je za těchto podmínek plně závislá na aktivitě *CHK2*.

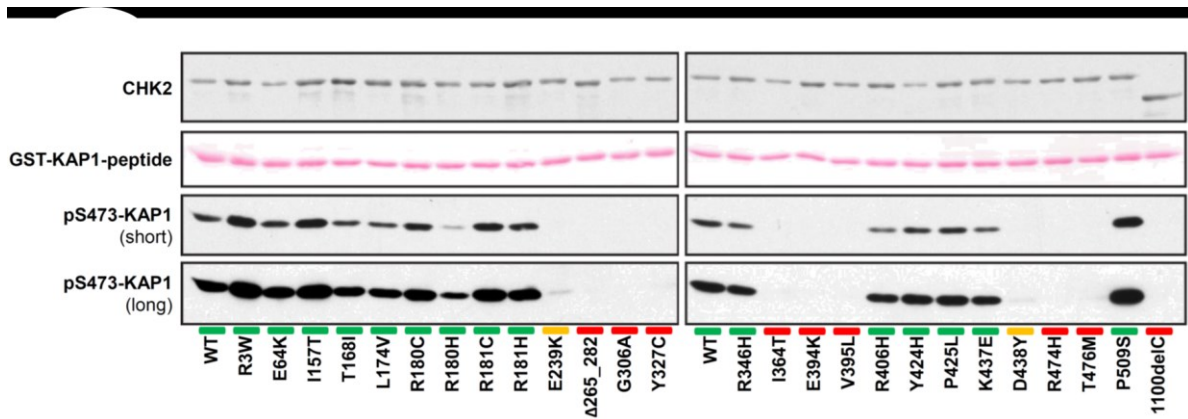


Obr. 13. Reakce parentálních RPE1 a buněk RPE1-*CHEK2*-KO na ionizační záření (3 Gy), neokarcinostatin (10 nM) a etoposid (5 μ M) ve srovnání s neošetřenými buňkami po 4 h.

Mnohonásobně vyšší exprese při transientní transfekci v porovnání s endogenním *CHK2* je plně dostačující pro aktivaci kinázové aktivity a další poškození v podobě ionizačního záření

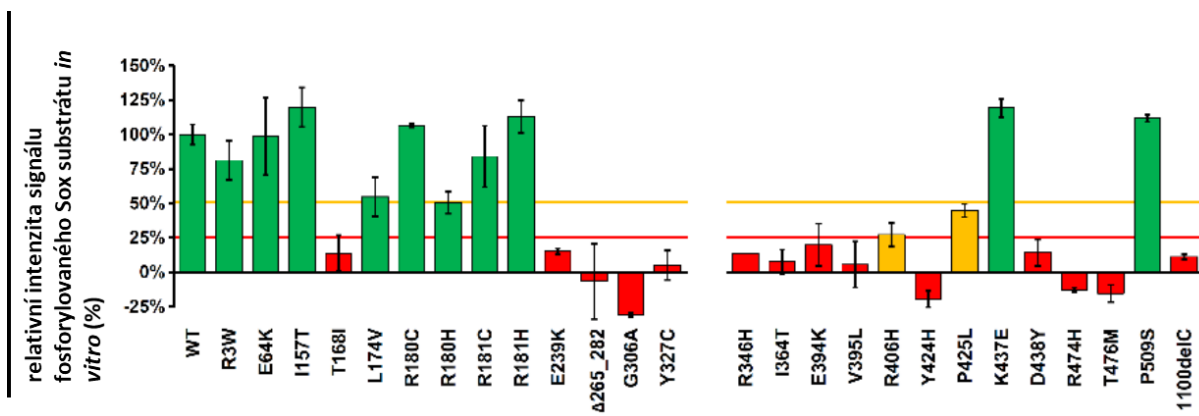
nevyvolá u buněk transfekovaných EGFP-*CHEK2*-WT vyšší signál pSer473 KAP1 v porovnání s neozářenými.

Tento systém jsme 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 (Obr. 14).



Obr. 14. Schopnost purifikovaných variantních kináz fosforylovat substrát Ser473 KAP1 *in vitro*. Kontrola přítomnosti a množství proteinu CHK2 v prvním řádku (zkrácená varianta c.1100delC migruje níže), ve druhém řádku GST-KAP1 substrát (barvení ponceau). Signál pSer473 KAP1 při krátké a dlouhé expozici.

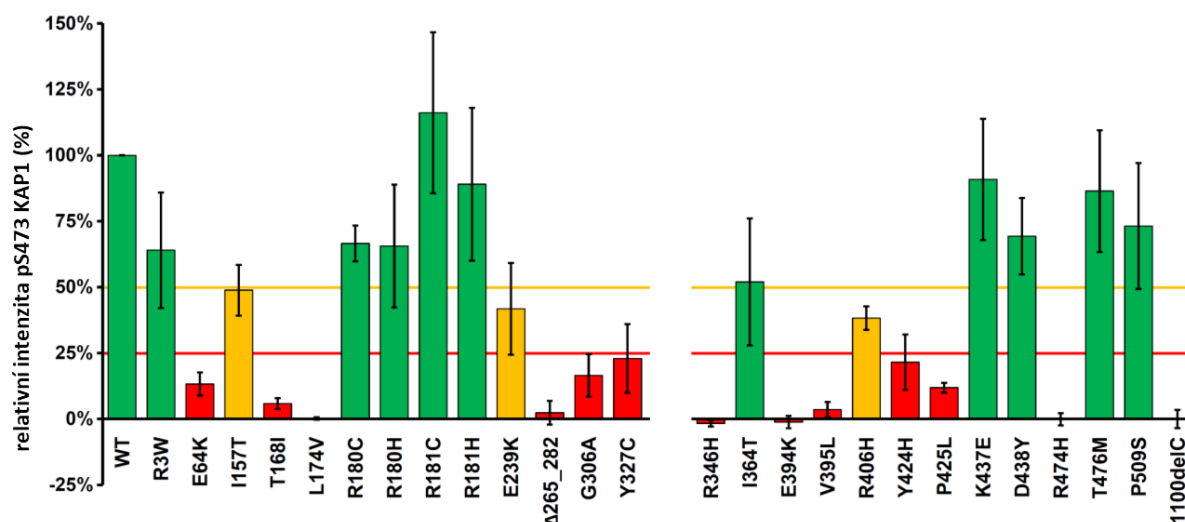
Analýzy byly nadto obohaceny o výsledky experimentů komerčně dostupné *in vitro* kinázové analýzy Omnia kinase assay (Life Technologies) v bakteriálních lyzátech, jejíž metodiku jsem již zpracovala v rámci své diplomové práce. (Obr. 15)



Obr. 15. Výsledky funkční kinázové analýzy *in vitro* provedené komerčně dostupnou Omnia kinázovou esejí. Studována byla aktivita variantních kináz vůči arteficiálnímu substrátu s navázaným fluoroforem. Normalizováno k aktivitě wild-type proteinu CHK2 (100 %).

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 kinázy CHK2 důležití pro její funkci a aktivaci. Tímto přístupem jsme byli schopni rozlišit aktivitu variant do tří skupin – nefunkční, snížená aktivita a plně zachovaná aktivita (Obr. 16).



Obr. 16. 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. Pro určení vlivu a asociace s karcinomem ovaria budou nutné další studie na větším souboru. Podařilo se nám zavést metodu analýzy VUS *CHEK2* díky, které jsme prokázali, že funkčně patogenní missense varianty jsou více zastoupeny u pacientů.

Mým podílem na publikaci byl výběr a příprava vzorků, NGS analýzy, identifikace variant a jejich confirmace, HRM analýzy exonů 11-14 *CHEK2* nepokrytých v panelu CZECANCA verze 1.0. V rámci funkčních analýz jsem připravila všechny použité konstrukty plazmidů a provedla funkční charakterizaci variant *in vitro*, charakterizovala jsem vytvořený modelový systém buněk RPE1-CHEK2-KO a spolu s Mgr. Kateřinou Křížovou jsem zavedla imunofluorescenční analýzu studovaných missense variant. Podílela jsem se na přípravě manuskriptu.

5.6 **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 shrnuli 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 genu *CHEK2* v různých populacích a u pacientů s různými onkologickými diagnózami.

Zárodečné mutace v *CHEK2* byly zpočátku spojovány s Li-Fraumeni syndromem (LFS; bez výskytu patogenních mutací genu *TP53*) a karcinomem prsu. Následující studie sice prokázaly, že spojení s LFS není pravděpodobně kauzální, avšak identifikovaly nosiče dědičných variant *CHEK2* v souvislosti s řadou jiných nádorových onemocnění. Značnou komplikací interpretace nálezů dědičných variant genu *CHEK2* je významná populační proměnlivost jejich výskytu a značně odlišné populačně-specifické prevalence.

Nejčastěji analyzovanými dědičnými variantami genu *CHEK2* byla posunová mutace c.1100delC, která se nejvíce vyskytuje v germánských populacích západní Evropy a missense varianta c.470C>T (p.I157T), nejčastěji se vyskytující ve slovanských populacích, včetně populace naší. S ohledem na značnou populační frekvenci, která u nás přesahuje 2% u osob kontrolního souboru lze prakticky vyloučit, že by varianta p.I157T znamenala klinicky závažnou variantu významně ovlivňující riziko vzniku nádorového onemocnění u heterozygotních nosičů. Nicméně, i výsledky naší funkční analýzy (Publikace 5) prokázaly, že homozygotní výskyt této varianty (u cca 1:2500 osob) může znamenat střední riziko pro vznik karcinomu prsu u nosiček a dalších nádorových onemocnění u nosičů varianty bez ohledu na pohlaví.

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.

V publikaci jsme zhodnotili klinický význam hereditárních mutací *CHEK2* u pacientek s karcinomem prsu, pacientů s karcinomem prostaty, nemocných s nádory ledvin, papilárním karcinomem štítné žlázy a kolorektálním karcinomem v různých populacích.

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.

Mým podílem na této publikaci byla literární rešerše, příprava podkladů, příprava částí shrnujících strukturu genu a proteinu, funkční charakteristiky CHK2 kinázy, příprava obrazových podkladů a psaní manuskriptu.

6 Diskuze

Nádorová onemocnění představují v současné době druhou nejčastější příčinu úmrtí ve vyspělých zemích. Ačkoliv většina nemocných s onkologickými diagnózami vyvine sporadickou formu 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.

Zavedení NGS do klinické diagnostiky v předchozím desetiletí znamenalo významnou změnu umožňující rychle a spolehlivě analyzovat rozsáhlé sety – panely – predispozičních genů. Přístup k panelovému sekvenování se však liší v jednotlivých zemích v důsledku ekonomických, zdravotnických, i právních zvyklostí. Zatímco na severoamerickém kontinentu je zvykem používat malé, nádorově specifické panely, Evropa dává často přednost rozsáhlejšímu multinádorovým panelům (Soukupova 2016). Malé panely mají výhodu v rychlé a méně komplikované interpretaci nacházených variant, velké panely v univerzálnosti použití napříč širokým spektrem nádorových onemocnění. Technická příprava pro oba postupy je obdobná a liší se pouze v detailech daných různými protokoly výrobců sekvenačních knihoven a obohacujících prób. Po technické stránce je analýza germinálního genomu nejjednodušší NGS analýzou nukleových kyselin s mnohem nižší náročností než analýza epigenomů, transkriptomu, či somatických genetických variant. Pomineme-li vzácné případy postzygotického mozaicismu, pro vyhodnocení přítomnosti heterozygotních variant postačuje pokrytí cílové oblasti minimálně 20 čteními (ready – 20×), optimálně 35× (Sims, Sudbery et al. 2014).

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 CZECANCA.

S klesajícími náklady a rostoucím potenciálem NGS se postupně rozvíjejí úvahy o významu populačního screeningu (Guzauskas, Garbett et al. 2020). Na nákladové hodnocení v ČR si však budeme muset ještě počkat.

Snižování nákladů na NGS umožňuje uvažovat o sekvenování exomů či genomů u analyzovaných pacientů. Výhodou tohoto přístupu by byla univerzálnost použití jednotné technologie pro analýzu genomů bez ohledu na studované onemocnění. Genomy či exomy by pro řadu situací, včetně nádorové predispozice, nebyly analyzovány celé, ale ve formě „virtuálních“ panelů zacílených na analýzu vybraných genů se známou souvislostí s příslušným onemocněním. Výhodou virtuálních panelů je omezení interpretační nejistoty u varianty nejasného významu, které jsou největší komplikací klinické interpretace analýz germinální genetické informace. Klinicky obtížné VUS tvoří převážně missense varianty, které se podílejí značným počtem na množství všech identifikovaných variant (Young, Feng et al. 2016). Jejich množství roste úměrně s délkou vyšetřované cílové sekvence DNA. V porovnání s klinickým exomem (~40 Mb) odhaluje panel CZECANCA (~0.6 Mb) přibližně 60-krát nižší počet VUS variant. Tyto varianty tvoří zásadní diagnostické rozpaky především v situaci, kdy 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 (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. *In silico* predikční programy se v hodnocení funkčního významu missense variant mnohdy liší, pracují většinou na základě evoluční konzervativnosti aminokyselinových zbytků v jednotlivých pozicích, jejich chemických vlastností či kombinaci přístupů. Téměř celá kódující sekvence *CHEK2* tvoří funkční proteinové domény, mnoho nalezených variant tedy zasahuje významné aminokyselinové zbytky a je těžké předem určit jejich biologický dopad. Nejvíce vypovídající jsou proto práce experimentálně charakterizující vliv jednotlivých sekvenčních variant na funkci proteinu.

Ovlivněna může být stabilita variantního proteinu, schopnost dimerizace či lokalizace. Experimenty v systému *in vitro* (Bell, Kim et al. 2007, Manoukian, Peissel et al. 2011) či modely využívající bakteriální systém (Desrichard, Bidet et al. 2011) mohou ve svém nastavení opomíjet nepřítomnost signálních drah a nadřazených elementů důležitých pro aktivaci kinázy CHK2, které jsou přítomny ve vyšších systémech. Jiné skupiny využily kvasinkového modelu (Shaag, Walsh et al. 2005, Tischkowitz, Yilmaz et al. 2008, Roeb, Higgins et al. 2012, Delimitsou, Fostira et al. 2019), ve kterém se už endogenně homology CHK2 vyskytují. Za nejpřesnější se samozřejmě považují lidské buněčné linie jako klinicky nejrelevantnější model (Kleiblova, Stolarova et al. 2019).

Ve své předcházející diplomové práci jsem pro funkční charakterizaci identifikovaných variant CHK2 využila komerční *in vitro* kinázovou analýzu, která hodnotila enzymatickou aktivitu vůči syntetickému substrátu v celkovém bakteriálním lyzátu (Desrichard, Bidet et al. 2011). Použitý typ analýzy byl vhodný zejména pro hodnocení variant v kinázové doméně, jelikož v bakteriálních buňkách se CHK2 přirozeně nevyskytuje a chybí interakční partneři kinázy, kteří mohou dále ovlivňovat její aktivaci a funkci. Z tohoto důvodu jsme se v rámci mezinárodní spolupráce s Angeliki Delimitsou rozhodli využít kvasinkového modelu (Delimitsou, Fostira et al. 2019), ve kterém se již homology CHK2 vyskytují a stejně tak i interakční partneři, včetně hlavního aktivátoru ATM. Přestože kvasinkový model byl použit již v předchozích analýzách CHK2 (Roeb, Higgins et al. 2012), domníváme se, že pro hodnověrné funkční hodnocení sloužící jako podklad ke klinické interpretaci *CHEK2* VUS by bylo vhodnější studium analyzovaných variant v lidských buňkách.

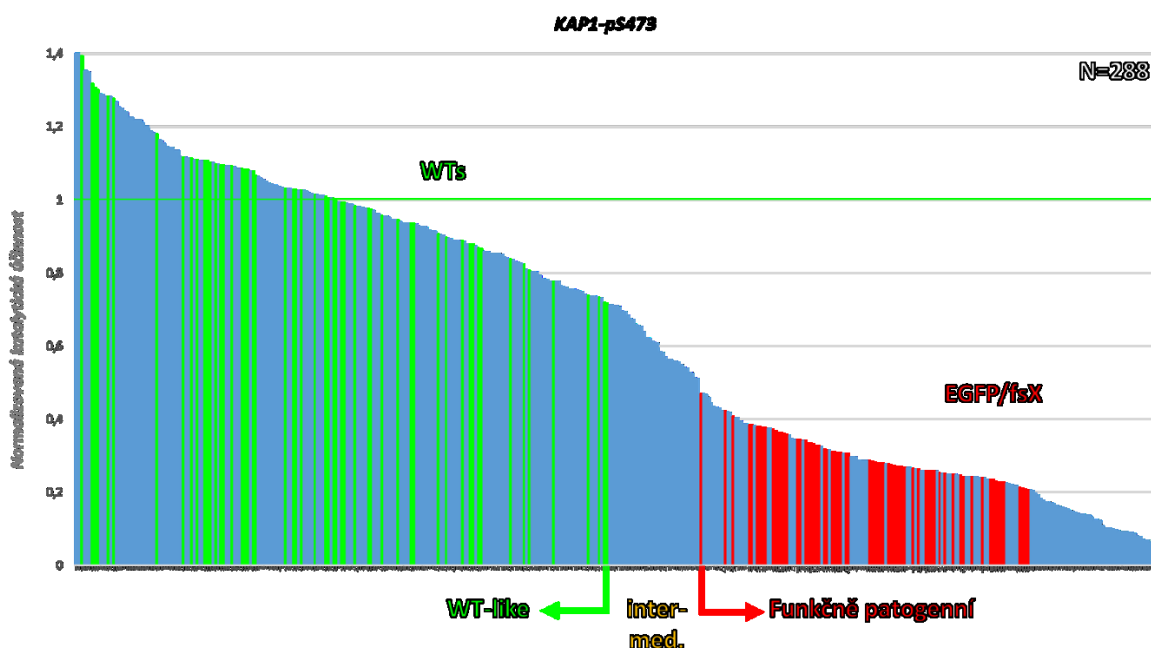
Pro další analýzy jsme se rozhodli vytvořit nový modelový systém, jenž by byl blíže fyziologickému stavu v normálních lidských buňkách. V lidské nenádorové buněčné linii hTERT-RPE1 jsme CRISPR/Cas9 přístupem vytvořili knockout genu *CHEK2*. Do RPE1-*CHEK2*-KO buněk jsme transientně transfekovali plazmidy 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. KAP1 je fosforylován přímo kinázou ATM, aktivátorem CHK2, na Ser824 a to v brzké fázi odpovědi na poškození do 30 min, s nejvyšším signálem přibližně v 1 h, který pak po 3 h mizí. Oproti tomu fosforylace Ser473 se objevuje po 1 h a přetrvává až 6 h po neokarcinostatinu. 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.

Již dříve bylo publikováno, že nadprodukce CHK2 v bakteriálních buňkách vyvolá kinázovou aktivitu (Schwarz, Lovly et al. 2003), čehož jsem využila i v předchozí kinázové analýze. Při transientní transfekci RPE1-*CHEK2*-KO buněk je taktéž mnohonásobně vyšší ektopická exprese pro aktivaci dostatečná. Dodatečné ozáření buněk transfekovaných kontrolní wild-type variantou CHK2 a katalyticky neaktivní c.1100delC není schopno vybudit vyšší kinázovou aktivitu v porovnání s neozářenými buňkami.

Značení variantních proteinů CHK2 pomocí fluorescenční značky GFP nám umožňuje detekci variantních kináz bez nutnosti použití protilátky navíc. Přestože je ektopická exprese mnohonásobně vyšší než je endogenní úroveň, snažili jsme se náš model přiblížit co nejvíce fyziologickému stavu buňky, a proto jsme pro vyhodnocení aktivit do analýzy vždy zahrnovali buňky s nízkou hladinou exprese GFP. Mikroskopická analýza má nevýhodu v poměrně vysoké časové náročnosti pro velké množství vzorků, nespornou výhodou jsou však snímky buněk v jednotlivých kanálech, což nám umožňuje jasné zhodnocení lokalizace proteinu v buňce. Jaderný lokalizační signál CHK2 se nachází na jeho C-konci, některé varianty zkracující proteinový produkt postrádají značnou část sekvence CHK2 včetně jaderného signálu a ze snímků je patrné, že nejsou schopny lokalizovat do jádra a zůstávají v cytoplazmě, kde taktéž mohou vytvářet agregáty. Tyto varianty jsou v naprosté většině enzymaticky neaktivní a tedy jejich nesprávná lokalizace znamená jen potvrzení neschopnosti fosforylovat jaderné cíle. Existuje však řada missense variant, ve kterých se variantní aminokyselina v sekvenci nachází

až za kinázovou doménou a enzymatická aktivita je tedy plně zachována, porušena je však sekvence jaderného lokalizačního signálu. Takové varianty jsou v analýzách *in vitro* studující izolované proteiny hodnoceny jako plně aktivní, shodně s wild-type variantou proteinu, v kontextu buňky se ale nedokáží dostat do jádra a správně by tedy měly být hodnoceny jako nefunkční.

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. 17).

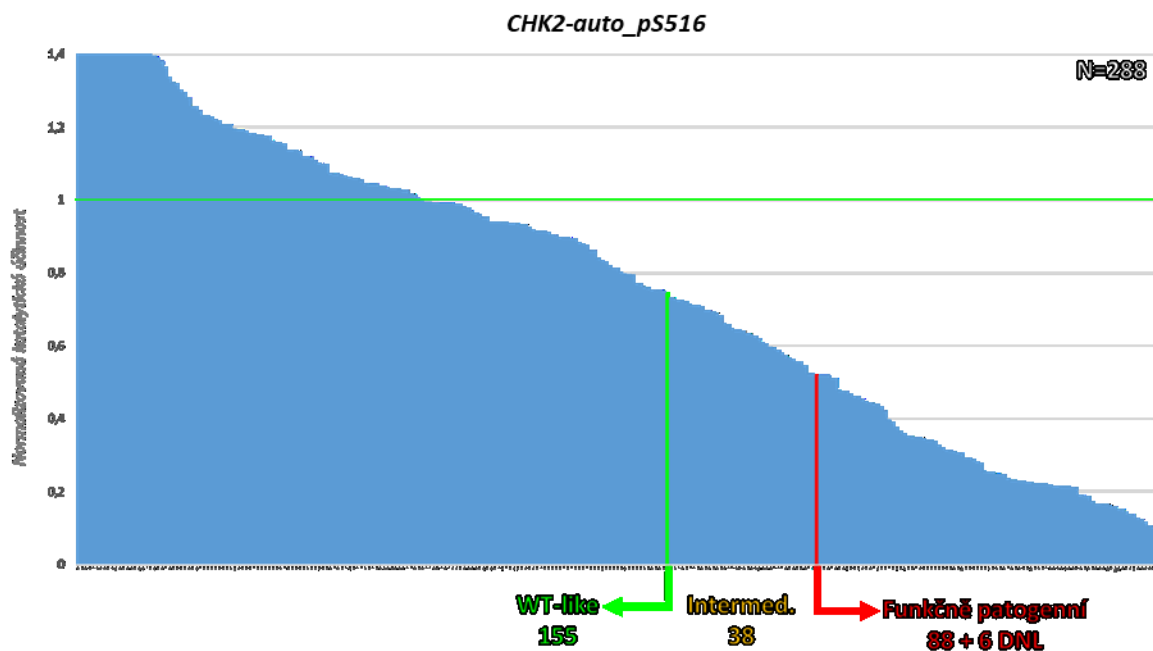


Obr. 17. Hodnocení aktivity variantních kináz CHK2 v analýze fosorylace Ser473 KAP1. Analyzováno bylo 288 různých variant, které jsou zde seřazeny dle aktivit (od nejvyšší aktivity po nejnižší). Jako funkční, s aktivitou odpovídající wild-type CHK2, byly hodnoceny varianty skórující jako nejméně aktivní replikát wild-type CHK2 reference. Za funkčně patogenní jsme považovali varianty, jejichž aktivita odpovídala negativním referencím, c.1100delC a EGFP. Varianty, jejichž aktivita spadala mezi předešlé skupiny, byly označeny jako intermediární.

Pro velké množství variant bylo nutné modifikovat proces analýzy, abychom zkrátily časovou náročnost na zpracování na jeden vzorek a dosáhli konzistentních a reprodukovatelných výsledků. Z formátu sklíček a transfekce buněk na 6-jamkové destičce jsem přešla na 96-jamkovou destičku se skleněným dnem, ve které probíhá veškeré zpracování, včetně mikroskopického snímání a je tak zamezeno manipulaci se sklíčky v průběhu imunofluorescenčního barvení a možným záměnám variant. V každé destičce bylo vždy

analyzováno 48 unikátních vzorků a 12 referenčních (3× wild-type, 3× EGFP a 3× c.1100delC), abychom byli schopni sledovat případnou variabilitu.

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. 18).

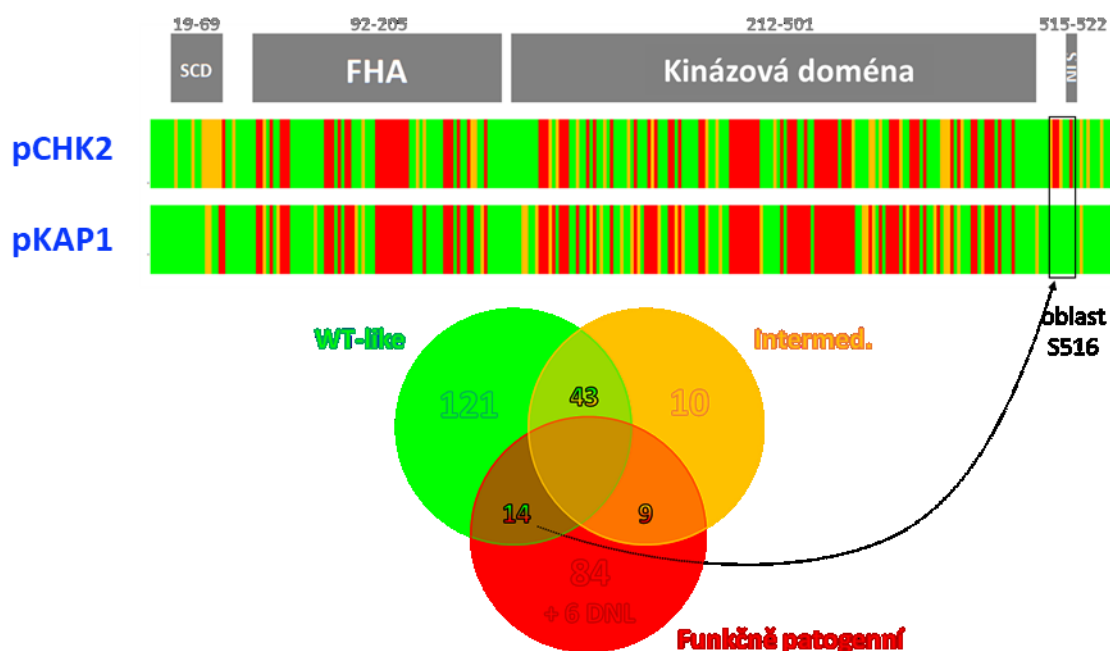


Obr. 18. Výsledky paralelní analýzy, která hodnotila schopnost autofosforylace na Ser516 u všech 288 variant CHK2. Negativní referencí v této analýze byla varianta p.D265_H282del, kterou jsme již dříve hodnotili jako nefunkční, ale se zachovaným epitopem pro protilátku pSer516 CHK2. Výsledné aktivity jednotlivých variant normalizovaných k wild-type CHK2 jsou seřazeny od nejvyšší po nejméně aktivní.

Zpracování a analýza vzorků probíhala shodně s analýzou fosforylace KAP1, s výjimkou použitých negativních referencí. V případě autofosforylace jsem nemohla použít katalyticky neaktivní variantu c.1100delC, jelikož postrádá část kinázové domény (p.T367fsX) včetně epitopu pro protilátku proti pSer516. Plazmid s prázdným EGFP neobsahuje žádnou sekvenci *CHEK2* a tudíž rovněž nemohl být použit. Jako negativní kontrolu jsem zvolila

katalycky nefunkční variantu p.D265_H282del s in-frame delecí exonu 7, které chybí 18 aminokyselin v kinázové doméně, avšak epitop pro protilátku je intaktní. Úplnou ztrátu její kinázové aktivity jsme charakterizovali v předchozí studii (Kleiblova, Stolarova et al. 2019).

Soubor všech 288 analyzovaných variant jsem tedy hodnotila ve dvou různých analýzách – schopnosti autofosforylace Ser516 a fosforylace endogenního substrátu Ser473 KAP1 – aktivity byly vždy vztaženy 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. 19).



Obr. 19. 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..

Prostor k zamyšlení představují některé varianty (např. p.A230V, p.E302D, p.K373R), které dosahovaly plné aktivity v autofosforylační analýze, ale nebyly schopné fosforylovat Ser473 KAP1. Zdá se, že tyto varianty mají zachovanou kinázovou aktivitu, avšak mohou mít defekt v rozpoznání či vazbě konkrétního substrátu. Několik variant (p.P509L, p.P509S, p.R519L) naopak nevykazovalo schopnost autofosforylace při plné aktivitě vůči KAP1. V tomto případě je varianta pravděpodobně buďto přímo u epitopu protilátky nebo je změněná aminokyselina

chemicky natolik odlišná od původní, že protilátka není schopna fosforylaci pSer516 rozeznat. U některých (např. p.E64K, p.R117G, p.R117A) jsem opakovaně pozorovala v obou analýzách značný rozdíl mezi buňkami s nízkou a vysokou expresí proteinu. Jednalo se většinou o varianty v SCD a FHA doménách, které slouží k prvotní aktivaci CHK2 a dimerizaci. Tyto varianty mají nejspíše zachovanou kinázovou aktivitu, ale je prodloužen proces jejich aktivace a může jim trvat déle vytvoření přechodného dimeru či v něm déle setrvávají. U varianty p.R117A bylo dříve popsáno, že narušuje vazbu fosfopeptidu s pThr68 (Ahn, Li et al. 2002). Vyšší koncentrace proteinu a více stresu v podobě ozáření představuje podnět, po kterém jsou tyto varianty plně aktivní.

Vliv aminokyselinových záměn samozřejmě především záleží, ve které z funkčních domén se nachází. Varianty v kinázové doméně ovlivňují enzymatickou aktivitu, záměny v FHA doméně, jakožto interakčního modulu, schopnost rozeznání substrátu. SCD obsahuje zbytky důležité pro aktivační fosforylaci, především Thr68, proto záměny v této oblasti mohou způsobovat pomalejší aktivaci kinázy. Fosforylace Thr68 kinázou ATM je konzervovaným mechanismem, a jejich homology jsou Thr11 Cds1 u *Schizosaccharomyces pombe*, jenž je fosforylován kinázou Rad3p. Serin/threoninových zbytků v SCD doméně je více a jejich fosforylaci lze nejspíše částečně zastoupit absencí aktivačního Thr68. Interakce pThr68 s FHA doménou druhého protomeru urychluje proces dimerizace, mezi FHA doménami jsou však přítomny slabé interakce i při absenci této aktivační fosforylace (Li, Taylor et al. 2008, Cai, Chehab et al. 2009). Právě mutace v SCD i FHA doméně mohou znemožňovat dimerizaci CHK2 úplně. Varianta p.I157T, prvotně identifikována v rodině s Li-Fraumeni syndromem (Bell, Varley et al. 1999), byla od svého objevu zařazena do několika funkčních studií, ale její výsledné hodnocení stále není konkluzivní. Ile157 se ve struktuře proteinu nachází přímo v centru hydrofobního rozhraní FHA a kinázové domény a jeho záměna za threonin s polární skupinou v tomto prostředí strukturu destabilizuje. Narušení dimerizace varianty p.I157T bylo reportováno v experimentech *in vitro* (Cai, Chehab et al. 2009) i v myších embryonálních fibroblastech (MEFS) s deplecí Chk2 (*Chk2^{-/-}*) (Schwarz, Lovly et al. 2003). V dalších studiích ale poruchu aktivace této varianty nepozorovali, což jiní připisují přítomnosti endogenního CHK2 v použitém buněčném systému a tvorbě heterodimerů (Lee and Chung 2001, Wu, Webster et al. 2001). V naší analýze jsme opakovaně pozorovali, že p.I157T má mírně sníženou aktivitu oproti wild-type CHK2, a tento pokles může být spojen s pomalejší schopností dimerizace. Při dostatečném podnětu aktivace v podobě ionizačního záření či vysoké exprese proteinu je varianta plně aktivní. Proto je přítomnost nadřazených aktivačních proteinů

a interakčních partnerů v modelovém systému zásadní pro simulaci fyziologických procesů buňky v odpovědi na poškození DNA.

Některé záměny jsou chemicky tak odlišné, že pokud se nacházejí v důležitých konzervovaných pozicích, mohou mít vliv na správné složení proteinu. Takový protein se pak může stát nestabilním a být rychleji degradován. Příkladem je varianta p.R145W, kdy se aminokyselina nachází v konzervované části proteinu a záměnou je narušen α -helix, což vede k destabilizaci proteinu. Obdobně je tomu i u varianty p.H143A v konzervované struktuře β -listu, kde záměna znemožňuje vazbu substrátu. Tyto varianty v naší analýze vykazovaly velmi nízkou schopnost fosforylovat Ser473 KAP1, která byla srovnatelná s negativními referencemi, a byly hodnoceny jako neaktivní.

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.

7 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 CZECANCA, 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 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 tumorogeneze 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.

8 Literatura

- Ahn, J., Urist, M., & Prives, C. (2004). The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9), 1039-1047.
- Ahn, J. Y., Li, X., Davis, H. L., & Canman, C. E. (2002). Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. *J Biol Chem*, 277(22), 19389-19395.
- Alves-Fernandes, D. K., & Jasiulionis, M. G. (2019). The Role of SIRT1 on DNA Damage Response and Epigenetic Alterations in Cancer. *Int J Mol Sci*, 20(13).
- Bahassi el, M., Myer, D. L., McKenney, R. J., Hennigan, R. F., & Stambrook, P. J. (2006). Priming phosphorylation of Chk2 by polo-like kinase 3 (Plk3) mediates its full activation by ATM and a downstream checkpoint in response to DNA damage. *Mutat Res*, 596(1-2), 166-176.
- Bell, D. W., Kim, S. H., Godwin, A. K., Schiripo, T. A., Harris, P. L., et al. (2007). Genetic and functional analysis of CHEK2 (CHK2) variants in multiethnic cohorts. *Int J Cancer*, 121(12), 2661-2667.
- Bell, D. W., Varley, J. M., Szydlo, T. E., Kang, D. H., Wahrer, D. C., et al. (1999). Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science*, 286(5449), 2528-2531.
- Bohgaki, M., Hakem, A., Halaby, M. J., Bohgaki, T., Li, Q., et al. (2013). The E3 ligase PIRH2 polyubiquitylates CHK2 and regulates its turnover. *Cell Death Differ*, 20(6), 812-822.
- 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.
- Burke, L. J., Sevcik, J., Gambino, G., Tudini, E., Mucaki, E. J., et al. (2018). BRCA1 and BRCA2 5' noncoding region variants identified in breast cancer patients alter promoter activity and protein binding. *Hum Mutat*, 39(12), 2025-2039.
- Cai, Z., Chehab, N. H., & Pavletich, N. P. (2009). Structure and activation mechanism of the CHK2 DNA damage checkpoint kinase. *Mol Cell*, 35(6), 818-829.
- Caligo, M. A., Agata, S., Aceto, G., Crucianelli, R., Manoukian, S., et al. (2004). The CHEK2 c.1100delC mutation plays an irrelevant role in breast cancer predisposition in Italy. *Hum Mutat*, 24(1), 100-101.

- Calvete, O., Garcia-Pavia, P., Dominguez, F., Bougeard, G., Kunze, K., et al. (2017). The wide spectrum of POT1 gene variants correlates with multiple cancer types. *Eur J Hum Genet*, 25(11), 1278-1281.
- Calvete, O., Martinez, P., Garcia-Pavia, P., Benitez-Buelga, C., Paumard-Hernandez, B., et al. (2015). A mutation in the POT1 gene is responsible for cardiac angiosarcoma in TP53-negative Li-Fraumeni-like families. *Nat Commun*, 6, 8383.
- Carlessi, L., Buscemi, G., Fontanella, E., & Delia, D. (2010). A protein phosphatase feedback mechanism regulates the basal phosphorylation of Chk2 kinase in the absence of DNA damage. *Biochim Biophys Acta*, 1803(10), 1213-1223.
- 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.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang le, L., Coon, M., Nguyen, T., et al. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*, 6(2), 80-92.
- Couch, F. J., Hart, S. N., Sharma, P., Toland, A. E., Wang, X., et al (2015). Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol*, 33(4), 304-311.
- Cybulski, C., Gorski, B., Huzarski, T., Masojc, B., Mierzejewski, M., et al (2004). CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet*, 75(6), 1131-1135.
- Cybulski, C., Huzarski, T., Byrski, T., Gronwald, J., Debniak, T., et al. (2009). Estrogen receptor status in CHEK2-positive breast cancers: implications for chemoprevention. *Clin Genet*, 75(1), 72-78.
- 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.
- Delimitsou, A., Fostira, F., Kalfakakou, D., Apostolou, P., Konstantopoulou, I., et al. (2019). Functional characterization of CHEK2 variants in a *Saccharomyces cerevisiae* system. *Hum Mutat*, 40(5), 631-648.
- Desrichard, A., Bidet, Y., Uhrhammer, N., & Bignon, Y. J. (2011). CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families. *Breast Cancer Res*, 13(6), R119.
- Dong, X., Wang, L., Taniguchi, K., Wang, X., Cunningham, J. M., et al. (2003). Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet*, 72(2), 270-280.
- Donzelli, M., & Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep*, 4(7), 671-677.

- Fachal, L., Santamarina, M., Blanco, A., Carracedo, A., & Vega, A. (2013). CHEK2 c.1100delC mutation among non-BRCA1/2 Spanish hereditary breast cancer families. *Clin.Transl.Oncol.*, 15(2), 164-165.
- 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., Machackova, E., Palacova, M., Navratilova, M., Svoboda, M., & Petrakova, K. (2016). Recommended Extension of Indication Criteria for Genetic Testing of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Klin Onkol*, 29 Suppl 1, S9-13.
- 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.
- Garcia-Limones, C., Lara-Chica, M., Jimenez-Jimenez, C., Perez, M., Moreno, P., et al. (2016). CHK2 stability is regulated by the E3 ubiquitin ligase SIAH2. *Oncogene*, 35(33), 4289-4301.
- Guo, Q. Q., Wang, S. S., Zhang, S. S., Xu, H. D., Li, X. M., et al. (2020). ATM-CHK2-Beclin 1 axis promotes autophagy to maintain ROS homeostasis under oxidative stress. *EMBO J*, 39(10), e103111.
- Guzauskas, G. F., Garbett, S., Zhou, Z., Spencer, S. J., Smith, H. S., et al. (2020). Cost-effectiveness of Population-Wide Genomic Screening for Hereditary Breast and Ovarian Cancer in the United States. *JAMA Netw Open*, 3(10), e2022874.
- Hauke, J., Horvath, J., Gross, E., Gehrig, A., Honisch, E., et al. (2018). Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Med*, 7(4), 1349-1358.
- 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.
- Huzarski, T., Cybulski, C., Domagala, W., Gronwald, J., Byrski, T., et al. (2005). Pathology of breast cancer in women with constitutional CHEK2 mutations. *Breast Cancer Res Treat*, 90(2), 187-189.
- Chabalier-Taste, C., Racca, C., Dozier, C., & Larminat, F. (2008). BRCA1 is regulated by Chk2 in response to spindle damage. *Biochim Biophys Acta*, 1783(12), 2223-2233.

- Chang, C. W., Chou, H. Y., Lin, Y. S., Huang, K. H., Chang, C. J., et al. (2008). Phosphorylation at Ser473 regulates heterochromatin protein 1 binding and corepressor function of TIF1beta/KAP1. *BMC Mol Biol*, 9, 61.
- 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.
- Chen, Y., Wu, J., Liang, G., Geng, G., Zhao, F., et al. (2020). CHK2-FOXK axis promotes transcriptional control of autophagy programs. *Sci Adv*, 6(1), eaax5819.
- Cheng, Q., & Chen, J. (2010). Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell Cycle*, 9(3), 472-478.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159.
- Jack, M. T., Woo, R. A., Hirao, A., Cheung, A., Mak, T. W., & Lee, P. W. (2002). Chk2 is dispensable for p53-mediated G1 arrest but is required for a latent p53-mediated apoptotic response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(15), 9825-9829.
- Jallepalli, P. V., Lengauer, C., Vogelstein, B., & Bunz, F. (2003). The Chk2 tumor suppressor is not required for p53 responses in human cancer cells. *J Biol Chem*, 278(23), 20475-20479.
- 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.
- Kass, E. M., Ahn, J., Tanaka, T., Freed-Pastor, W. A., Keezer, S., & Prives, C. (2007). Stability of checkpoint kinase 2 is regulated via phosphorylation at serine 456. *J Biol Chem*, 282(41), 30311-30321.
- Kass, E. M., Poyurovsky, M. V., Zhu, Y., & Prives, C. (2009). Mdm2 and PCAF increase Chk2 ubiquitination and degradation independently of their intrinsic E3 ligase activities. *Cell Cycle*, 8(3), 430-437.
- Kendellen, M. F., Barrientos, K. S., & Counter, C. M. (2009). POT1 association with TRF2 regulates telomere length. *Mol Cell Biol*, 29(20), 5611-5619.
- Kibe, T., Zimmermann, M., & de Lange, T. (2016). TPP1 Blocks an ATR-Mediated Resection Mechanism at Telomeres. *Mol Cell*, 61(2), 236-246.
- King, M. C., Marks, J. H., Mandell, J. B., & New York Breast Cancer Study, G. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302(5645), 643-646.
- Kleibl, Z., & Kristensen, V. N. (2016). Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *Breast*, 28, 136-144.

- Kleibl, Z., Novotny, J., Bezdickova, D., Malik, R., Kleiblova, P., et al. (2005). The CHEK2 c.1100delC germline mutation rarely contributes to breast cancer development in the Czech Republic. *Breast Cancer Res Treat*, 90(2), 165-167.
- Kleiblova, P., Stolarova, L., Krizova, K., Lhota, F., Hojny, J., et al (2019a). Germline CHEK2 Gene Mutations in Hereditary Breast Cancer Predisposition - Mutation Types and their Biological and Clinical Relevance. *Klin Onkol*, 32(Supplementum2), 36-50.
- Kleiblova, P., Stolarova, L., Krizova, K., Lhota, F., Hojny, J., et al. (2019b). Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2019 Oct 1;145(7):1782-1797.
- Krejci, D., Zapletalova, M., Svobodova, I., Pehalova, L., Muzik, J., et al. (2019). Epidemiological Trends for Childhood and Adolescent Cancers in the Period 1994-2016 in the Czech Republic. *Klin Onkol*, 32(6), 426-435.
- Kulkarni, A., & Carley, H. (2016). Advances in the recognition and management of hereditary cancer. *Br Med Bull*, 120(1), 123-138.
- Kurian, A. W., Gong, G. D., John, E. M., Johnston, D. A., Felberg, A., et al. (2011). Breast cancer risk for noncarriers of family-specific BRCA1 and BRCA2 mutations: findings from the Breast Cancer Family Registry. *J Clin Oncol*, 29(34), 4505-4509.
- Lee, D. H., Goodarzi, A. A., Adelmant, G. O., Pan, Y., Jeggo, P. A., Marto, J. A., & Chowdhury, D. (2012). Phosphoproteomic analysis reveals that PP4 dephosphorylates KAP-1 impacting the DNA damage response. *EMBO J*, 31(10), 2403-2415.
- Lee, C. H., & Chung, J. H. (2001). The hCds1 (Chk2)-FHA domain is essential for a chain of phosphorylation events on hCds1 that is induced by ionizing radiation. *J Biol Chem*, 276(32), 30537-30541.
- 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.
- Lhota, F., Zemankova, P., Kleiblova, P., Soukupova, J., Vocka, M., et al. (2016). Hereditary truncating mutations of DNA repair and other genes in BRCA1/BRCA2/PALB2-negatively tested breast cancer patients. *Clin Genet*, 90(4), 324-333.
- Lhotova, K., Stolarova, L., Zemankova, P., Vocka, M., Janatova, M., et al. (2020). Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*, 12(4).
- Li, J., Taylor, I. A., Lloyd, J., Clapperton, J. A., Howell, S., et al. (2008). Chk2 oligomerization studied by phosphopeptide ligation: implications for regulation and phosphodependent interactions. *J Biol Chem*, 283(51), 36019-36030.
- 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.

- Lindor, N. M., McMaster, M. L., Lindor, C. J., Greene, M. H., National Cancer Institute, D. o. C. P. C. O., & Prevention Trials Research, G. (2008). Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. *J Natl Cancer Inst Monogr*(38), 1-93.
- Loayza, D., & De Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*, 423(6943), 1013-1018.
- Lovly, C. M., Yan, L., Ryan, C. E., Takada, S., & Piwnica-Worms, H. (2008). Regulation of Chk2 ubiquitination and signaling through autophosphorylation of serine 379. *Mol Cell Biol*, 28(19), 5874-5885.
- Magni, M., Ruscica, V., Buscemi, G., Kim, J. E., Nachimuthu, B. T., et al. (2014). Chk2 and REGgamma-dependent DBC1 regulation in DNA damage induced apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 42(21), 13150-13160.
- Manoukian, S., Peissel, B., Frigerio, S., Lecis, D., Bartkova, J., et al. (2011). Two new CHEK2 germ-line variants detected in breast cancer/sarcoma families negative for BRCA1, BRCA2, and TP53 gene mutations. *Breast Cancer Res Treat*, 130(1), 207-215.
- 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.
- Meyer, A., Dork, T., Sohn, C., Karstens, J. H., & Bremer, M. (2007). Breast cancer in patients carrying a germ-line CHEK2 mutation: Outcome after breast conserving surgery and adjuvant radiotherapy. *Radiother Oncol*, 82(3), 349-353.
- Michailidou, K., Lindstrom, S., Dennis, J., Beesley, J., Hui, S., et al. (2017). Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. *Nature*, 551(7678), 92-94.
- Nai, S., Shi, Y., Ru, H., Ding, Y., Geng, Q., et al. (2019). Chk2-dependent phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1) regulates centrosome maturation. *Cell Cycle*, 18(20), 2651-2659.
- 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., Pelttari, 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.
- Petsalaki, E., & Zachos, G. (2020). DNA damage response proteins regulating mitotic cell division: double agents preserving genome stability. *FEBS J*, 287(9), 1700-1721.
- Pohlreich, P., Stribrna, J., Kleibl, Z., Zikan, M., Kalbacova, R., et al. (2003). Mutations of the BRCA1 gene in hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic. *Med Princ Pract*, 12(1), 23-29.
- 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.
- Rahman, N. (2014). Mainstreaming genetic testing of cancer predisposition genes. *Clin Med (Lond)*, 14(4), 436-439.
- Rainville, I., Hatcher, S., Rosenthal, E., Larson, K., Bernhisel, R., et al. (2020). High risk of breast cancer in women with biallelic pathogenic variants in CHEK2. *Breast Cancer Res Treat*, 180(2), 503-509.
- Roeb, W., Higgins, J., & King, M. C. (2012). Response to DNA damage of CHEK2 missense mutations in familial breast cancer. *Hum Mol Genet*, 21(12), 2738-2744.
- Sankaran, S., Starita, L. M., Groen, A. C., Ko, M. J., & Parvin, J. D. (2005). Centrosomal microtubule nucleation activity is inhibited by BRCA1-dependent ubiquitination. *Mol Cell Biol*, 25(19), 8656-8668.
- Seo, G. J., Kim, S. E., Lee, Y. M., Lee, J. W., Lee, J. R., et al. (2003). Determination of substrate specificity and putative substrates of Chk2 kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 304(2), 339-343.
- Shaag, A., Walsh, T., Renbaum, P., Kirchoff, T., Nafa, K., et al. (2005). Functional and genomic approaches reveal an ancient CHEK2 allele associated with breast cancer in the Ashkenazi Jewish population. *Hum Mol Genet*, 14(4), 555-563.
- Shaltiel, I. A., Aprelia, M., Saurin, A. T., Chowdhury, D., Kops, G. J., et al. (2014). Distinct phosphatases antagonize the p53 response in different phases of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(20), 7313-7318.
- Shang, Z., Yu, L., Lin, Y. F., Matsunaga, S., Shen, C. Y., & Chen, B. P. (2014). DNA-PKcs activates the Chk2-Bra1 pathway during mitosis to ensure chromosomal stability. *Oncogenesis*, 3, e85.
- Sharpless, N. E. (2005). INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res*, 576(1-2), 22-38.

- Schmidt, M. K., Hogervorst, F., van Hien, R., Cornelissen, S., Broeks, A., et al. (2016). Age- and Tumor Subtype-Specific Breast Cancer Risk Estimates for CHEK2*1100delC Carriers. *J Clin Oncol*, 34(23), 2750-2760.
- Schwarz, J. K., Lovly, C. M., & Piwnicka-Worms, H. (2003). Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *mol cancer res*, 1(8), 598-609.
- Sims, D., Sudbery, I., Illott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet*, 15(2), 121-132.
- Sodha, N., Williams, R., Mangion, J., Bullock, S. L., Yuille, M. R., & Eeles, R. A. (2000). Screening hCHK2 for mutations. *Science*, 289(5478), 359.
- Soukupova, J. (2016). Úskalí interpretace sekvenačních dat v diagnostice dědičných nádorových syndromů. *Labor Aktuell*(4), 23-26.
- Soukupova, J., Lhotova, K., Zemankova, P., Vocka, M., Janatova, M., et al. (2019). Contribution of Massive Parallel Sequencing to Diagnosis of Hereditary Ovarian Cancer in the Czech Republic. *Klin Onkol*, 32(Supplementum2), 72-78.
- Soukupova, J., Zemankova, P., Kleiblova, P., Janatova, M., & Kleibl, Z. (2016). CZE CANCA: 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 CZE CANCA (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.
- Stevens, C., Smith, L., & La Thangue, N. B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*, 5(5), 401-409.
- Stoffel, E. M., & Cooney, K. A. (2016). Advances in inherited cancers: Introduction. *Semin Oncol*, 43(5), 527.
- Stolarova, L., Jelinkova, S., Storchova, R., Machackova, E., Zemankova, P., et al. (2020). Identification of Germline Mutations in Melanoma Patients with Early Onset, Double Primary Tumors, or Family Cancer History by NGS Analysis of 217 Genes. *Biomedicines*, 8(10).
- Stolarova, L., Kleiblova, P., Janatova, M., Soukupova, J., Zemankova, P., et al. (2020). CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate. *Cells*, 9(12).
- Stolz, A., Ertych, N., & Bastians, H. (2011). Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. *Clin Cancer Res*, 17(3), 401-405.

- Stratton, M. R., & Rahman, N. (2008). The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet*, *40*(1), 17-22.
- Sun, J., Meng, H., Yao, L., Lv, M., Bai, J., et al. (2017). Germline Mutations in Cancer Susceptibility Genes in a Large Series of Unselected Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res*, *23*(20), 6113-6119.
- Sutcliffe, E. G., Stettner, A. R., Miller, S. A., Solomon, S. R., Marshall, M. L., et al. (2020). Differences in cancer prevalence among CHEK2 carriers identified via multi-gene panel testing. *Cancer Genet*, *246-247*, 12-17.
- Takai, H., Naka, K., Okada, Y., Watanabe, M., Harada, N., et al. (2002). Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J*, *21*(19), 5195-5205.
- 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.
- Tischkowitz, M. D., Yilmaz, A., Chen, L. Q., Karyadi, D. M., Novak, D., et al. (2008). Identification and characterization of novel SNPs in CHEK2 in Ashkenazi Jewish men with prostate cancer. *Cancer Lett*, *270*(1), 173-180.
- 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.
- Toss, A., Tomasello, C., Razzaboni, E., Contu, G., Grandi, G., et al. (2015). Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *Biomed Res Int*, *2015*, 341723.
- Tsvetkov, L., Xu, X., Li, J., & Stern, D. F. (2003). Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody. *J Biol Chem*, *278*(10), 8468-8475.
- Tsvetkov, L. M., Tsekova, R. T., Xu, X., & Stern, D. F. (2005). The Plk1 Polo box domain mediates a cell cycle and DNA damage regulated interaction with Chk2. *Cell Cycle*, *4*(4), 609-617.
- van Vugt, M. A., Gardino, A. K., Linding, R., Ostheimer, G. J., Reinhardt, H. C., et al. (2010). A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage checkpoint. *PLoS Biol*, *8*(1), e1000287.
- Vocka, M., Zimovjanova, M., Bielikova, Z., Tesarova, P., Petruzalka, L., et al. (2019). Estrogen Receptor Status Oppositely Modifies Breast Cancer Prognosis in BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers Versus Non-Carriers. *Cancers (Basel)*, *11*(6).
- Walsh, T., Casadei, S., Lee, M. K., Pennil, C. C., Nord, A. S., et al. (2011). Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(44), 18032-18037.

- Wang, L., Yang, L., Wang, C., Zhao, W., Ju, Z., et al. (2020). Inhibition of the ATM/Chk2 axis promotes cGAS/STING signaling in ARID1A-deficient tumors. *J Clin Invest*, 130(11), 5951-5966.
- Wu, J., Chen, Y., Geng, G., Li, L., Yin, P., et al. (2019). USP39 regulates DNA damage response and chemo-radiation resistance by deubiquitinating and stabilizing CHK2. *Cancer Lett*, 449, 114-124.
- 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.
- Wu, X., Webster, S. R., & Chen, J. (2001). Characterization of tumor-associated Chk2 mutations. *J Biol Chem*, 276(4), 2971-2974.
- Wu, Y., Yu, H., Zheng, S. L., Na, R., Mamawala, M., et al. (2018). A comprehensive evaluation of CHEK2 germline mutations in men with prostate cancer. *Prostate*, 78(8), 607-615.
- 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.
- Yadav, S., Hu, C., Hart, S. N., Boddicker, N., Polley, E. C., et al. (2020). Evaluation of Germline Genetic Testing Criteria in a Hospital-Based Series of Women With Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 38(13), 1409-1418.
- Yeh, C. W., Yu, Z. C., Chen, P. H., Cheng, Y. C., & Shieh, S. Y. (2014). Phosphorylation at threonine 288 by cell cycle checkpoint kinase 2 (CHK2) controls human monopolar spindle 1 (Mps1) kinetochore localization. *J Biol Chem*, 289(22), 15319-15327.
- Young, E. L., Feng, B. J., Stark, A. W., Damiola, F., Durand, G., et al. (2016). Multigene testing of moderate-risk genes: be mindful of the missense. *J Med Genet*, 53(6), 366-376.
- Zannini, L., Lecis, D., Lisanti, S., Benetti, R., Buscemi, G., et al. (2003). Karyopherin-alpha2 protein interacts with Chk2 and contributes to its nuclear import. *J Biol Chem*, 278(43), 42346-42351.
- 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.

9 Přílohy: vybrané publikované práce *in extenso*