

Hodnocení variant nejasného významu v genu *BRCA2*

Evaluation of Variants of Unknown Significance in the *BRCA2* gene

Heczková M.¹, Macháčková E.², Jirsa M.¹, Špičák J.³, Foretová L.², Hucl T.³

¹ Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

² Oddělení genetiky a epidemiologie nádorů, Masarykův onkologický ústav Brno

³ Klinika hepatogastroenterologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Souhrn

Východiska: Vlivem vnějších a vnitřních faktorů dochází v buňce neustále k poškození DNA. Mezi nejzávažnější poškození patří tvorba dvouřetězcových zlomů. Jejich bezchybná oprava se uskutečňuje především mechanismem homologní rekombinace, v němž jednu z klíčových úloh hraje protein BRCA2. Vrožené mutace v genu *BRCA2* jsou příčinou vzniku nádorů prsu, ovarií, pankreatu či jiných orgánů. Přítomnost patogenní mutace v *BRCA2* u pacientů či jejich rodinných příslušníků je důvodem k jejich dispenzarizaci s cílem včas zachytit nádorové onemocnění a je indikací k profylaktickým chirurgickým výkonům. Vedle zjevně patogenních mutací jsou v genu *BRCA2* často zjišťovány unikátní bodové varianty vedoucí pouze k záměně jedné aminokyseliny, u kterých je obtížné určit klinický význam. Vzhledem k možnému riziku vzniku nádorového onemocnění u nositelů těchto variant je jejich nejednoznačný význam závažným medicínským problémem. **Cíl:** Cílem tohoto článku je podat přehled o současných možnostech hodnocení patogenity variant v genu *BRCA2*. Genetické metody jsou v některých případech schopny patogenitu variant s vysokou pravděpodobností predikovat, jejich provedení je však často limitováno nízkou frekvencí varianty či nedostupností vzorků pro izolaci mRNA nebo vzorků DNA od rodinných příslušníků. Alternativou jsou v takových případech metody funkčního hodnocení variant prováděné v různých buněčných modelech. Jednotlivé funkční metody a buněčné modely jsou podrobně charakterizovány včetně jejich výhod a limitací. Dále je představen autory vyvinutý lidský nádorový syngenní buněčný model, ve kterém je jedna alela *BRCA2* genu nefunkční a do druhé je homologní rekombinací vnesena studovaná varianta. Tento model má potenciál hodnotit funkci variant s minimem nežádoucích vlivů jiných modelů. V současné době je tento model prakticky zkoušen u variant zjištěných u pacientů s dědičnou nádorovou predispozicí v Masarykově onkologickém ústavu. **Závěr:** Funkční testy v buněčných modelech včetně autory vyvinutého nového modelu syngenních buněčných linií představují velký potenciál k určení patogenity variant s nejasným klinickým významem v *BRCA2* genu, především tam, kde jsou genetické metody neproveditelné.

Klíčová slova

BRCA2 gen – varianty s nejasným významem – missense mutace – funkční testy

Práce byla podpořena grantem IGA NS/10536-3. Genetické testování na MOU podpořeno Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl - RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

The study was supported by: grant IGA NS/10536-3. Genetical testing was supported by the European Regional Development Fund and by the Czech republic's national budget (OP VaVpl - RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Tomáš Hucl, Ph.D.

Klinika hepatogastroenterologie
IKEM PRAHA

Vídeňská 9

140 21 Praha 4

e-mail: tohu@ikem.cz

Obdrženo/Submitted: 25. 1. 2012

Přijato/Accepted: 21. 5. 2012

Summary

Background: Endogenous processes and exogenous agents cause constant DNA damage. DNA double-strand breaks are among the most serious types of damage. They are mainly repaired by homologous recombination, where the BRCA2 protein plays a dominant role. Heterozygous germline *BRCA2* mutations predispose to breast, ovarian, pancreatic and other types of cancer. The presence of a pathogenic mutation in patients or their family members warrants close surveillance and prophylactic surgery. Apart from clearly pathogenic mutations, variants leading only to a single amino acid substitution are often identified. Since the influence of these variants on cancer risk is unknown, they represent a major clinical problem. **Aims:** The aim of this paper is to summarize the current possibilities of predicting pathogenicity of *BRCA2* variants. In some cases, genetic methods are able to classify variants with high probability; however, their use is often limited by low frequency of the variants or inaccessibility of samples for mRNA isolation or DNA from family members. Alternatively, functional assays performed in various cellular models may be employed. Multiple functional tests and cellular models are presented and characterized, including their advantages and limitations. A new model of human syngeneic cell lines developed by the authors is presented, in which one *BRCA2* allele is deleted and the variant is introduced into the other allele by homologous recombination. This model has the potential to evaluate function of variants without some of the unwanted effects of the other models. Currently, this model is being applied to variants identified in patients with hereditary cancer predisposition in the Masaryk Memorial Cancer Institute. **Conclusion:** Functional assays in cellular models including a new model of syngeneic cell lines described by the authors have a great potential in evaluating clinical importance of unclassified variants in the *BRCA2* gene, especially in cases where genetic tests are not applicable.

Key words

BRCA2 gene – variants of unknown significance – missense mutation – functional assays

Úvod

Působením nejrůznějších vnitřních a zevních faktorů je neustále poškozo- vána DNA. Mají-li buňky přežít, musí být schopny toto poškození v genetic- kém materiálu opravit. V průběhu evo- lucie proto vyvinuly řadu různých me- chanizmů opravy DNA. Pro každý typ poškození existuje jeden či několik spe- cifických způsobů opravy [1].

Jedním z nejzávažnějších typů po- škození DNA jsou dvouřetězcové zlomy (Double-Strand Breaks – DSB) vzniká- jící především působením ultrafialového záření, gama záření, volných radikálů a chemických látek. Zlomy jsou v S či G2 fázi buněčného cyklu, kdy je DNA zdvo- jená, a sesterská chromatida tak posky- tuje matrici, opraveny pomocí homo- logní rekombinace (HR). Nehomologní způsob opravy (Non-Homologous End Joining – NHEJ) převažuje v G1 fázi bu- něčného cyklu a představuje přímé spo- jení konců DNA, při kterém však může dojít ke ztrátě části DNA. Důležitým účastníkem opravy cestou homologní rekombinace je protein BRCA2 [1].

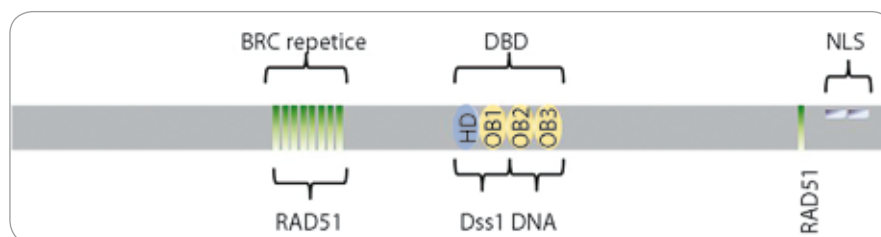
Gen *BRCA2* se skládá z 27 exonů a je lokalizovaný na chromozomu 13q12-13. Funkce genu není na biochemické úrovni zcela definovaná, avšak díky své roli v ho- mologní rekombinaci je gen řazen do skupiny genů udržujících neporušený genom. Protein BRCA2 se váže na rekombi- názu RAD51, umožní transport RAD51

do jádra na místo poškození, a regu- luje tak formování RAD51 nukleoprotei- nového filamenta, které je nezbytné pro opravu DNA homologní rekombinací [2]. Buňky s absencí proteinu BRCA2 tak mají sníženou schopnost opravy dvouřetěz- cových zlomů a vykazují zvýšenou citlivost k poškození DNA. Protein BRCA2 ve své struktuře obsahuje osm vazebných míst pro RAD51 lokalizovaných v místě vysoce konzervovaných BRC repetice a na C-konci proteinu. Mezi nimi leží domény zodpo- vědné za vazbu na DNA. Na C-konci se nachází signální sekvence pro lokalizaci pro- teinu v jádře [1–3] (obr. 1).

Nádorové onemocnění vzniká jako postupný proces změn (mutací) v ge- nomu. Během času buňky akumulují mutace v onkogenech, tumor supreso- rovéch genech či v genech udržujících neporušený genom. Vrozené, či získané

alterace v těchto genech pak vedou ke vzniku nádorů.

Germinální bialelické mutace v *BRCA2* způsobují vzácný typ Fanconioho anémie (FANCD1 skupina) [4]. Germinální mono- alelické (heterozygotní) mutace pak představují druhou nejčastější příčinu fa- miliárního karcinomu prsu a ovarií [5,6]. Kumulativní riziko pro vznik nádoru prsu u nositelů takové mutace do věku 70 let je až 84 % a pro karcinom ovaria 27 % [7]. Heterozygotní *BRCA2* mutace taktéž pre- disponují jedince ke vzniku karcinomu pankreatu – Hahn našel mutace v *BRCA2* až u 20 % pacientů s familiárním karci- nomem pankreatu [8]. Nositelé mutací v *BRCA2* mají také zvýšené riziko vzniku nádoru žlučníku, žlučových cest, žaludku a melanomu [6]. Vlastní nádory vznikají většinou v důsledku somatické ztráty (delece) druhé alely.



Obr. 1. Funkční domény proteinu BRCA2.

DBD (DNA-binding domain), doména vázající DNA; NLS (Nuclear Localization Signal), ja- derný lokalizační signál; HD (Helical Domain), helikální doména; OB (Oligonucleotide- Binding fold), doména vázající ssDNA; RAD51, místa vázající protein RAD51; Dss1, místo vázající protein Dss1.

Pacienti s vysokým rizikem dědičné formy nádorového onemocnění (např. pacienti s familiárním výskytem karcinomu prsu/ovaria, s bilaterálním nádorem prsu ve věku pod 50 let, pacienti s unilaterálním nádorem mladší 35 let, muži s nádorem prsu či specifické histologické podtypy nádorů) jsou indikováni k vyšetření klinickým genetikem a doporučení k vyšetření přítomnosti mutace v *BRCA2* genu [6,9].

Za zjevně patogenní mutace považujeme takové, které znemožňují syntézu funkčního proteinu (nonsense a frameshift mutace a mutace vyvolávající abnormální sestřih mRNA). Vedle jednoznačně patogenních mutací jsou v řadě genů včetně *BRCA2* zjišťovány mutace, které nevedou ke změně čtecího rámce. Nejčastěji se jedná o missense mutace vedoucí k záměně jedné aminokyseliny či o in-frame delece a inserce, u kterých nedochází ke změně čtecího rámce a důsledkem je delece, či inserce několika málo aminokyselin. Jejich význam pro funkci proteinu a pro riziko vzniku nádorového

onemocnění nelze jednoznačně určit, nazývají se tak mutace s nejasným významem (označované jako UV – Unclassified Variants nebo VUS – Variants of Unknown Significance) [3,10,11]. V případě *BRCA2* genu bylo doposud popsáno více než 1 100 různých variant (Breast Cancer Information Core, <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>), které tak představují až 40 % všech zjištěných sekvenčních alterací [7].

Vzhledem k tomu, že v některých souborech jsou takové varianty nalézány až u 13 % žen podstupujících genetické testování, jedná se o významný klinický problém [7]. V současné době stále není možné u většiny těchto variant pacientům říct, zda se jedná o mutace představující riziko vzniku nádorového onemocnění. Zhodnocení patogenity varianty je přitom pro pacienta a jeho rodinu zásadní, neboť nosičství patogenní varianty znamená zvýšené riziko onemocnění u rodinných příslušníků, zatímco u těch členů rodiny, kteří danou patogenní variantu nezdědí, je zvýšené riziko vyloučeno [6,9].

V současné době existuje řada metod, které si dávají za cíl určení patogenity variant. Tyto metody lze rozdělit na přímé, které využívají statistického zpracování genetických a epidemiologických dat, a metody nepřímé, které se odvíjejí od různých vlastností genu či proteinu. Výsledek přímých metod je vyjadřován většinou jako pravděpodobnostní poměr (Likelihood Ratio, LR) asociace varianty s chorobou. Souhrn přímých a nepřímých metod je uveden v tab. 1.

Přímé metody Segregace s chorobou

V případě postižení více členů rodiny a dostupnosti jejich genetického materiálu k vyšetření lze na patogenitu mutace usuzovat na základě segregace dané mutace s chorobou [12]. Jedná se o nejpřímější genetický důkaz souvislosti varianty se vznikem nádorového onemocnění. K průkazu významné pravděpodobnosti je však nutné získat DNA od co největšího množství rodinných členů, což bývá obtížné až

Tab. 1. Souhrn používaných testů k hodnocení patogenity *BRCA2* variant [10].

Typ testu	Výhody	Nevýhody
Přímé		
segregace s chorobou	jednoduše měřitelná, přímá souvislost s rizikem choroby, nezávislá na frekvenci mutace či typu populace	vyžaduje vzorky členů rodin
vyšetření kontrol	přímá souvislost s rizikem choroby	nutnost velkého množství kontrolních vzorků pro vzácnost variant
společná přítomnost s patogenní mutací	může klasifikovat variantu jako nepatogenní na základě jedné observace	méně přímá souvislost s rizikem choroby
rodinná anamnéza	často k dispozici u většiny variant bez nutnosti získávat další data či vzorky, potenciálně velmi účinná	závislá na způsobu sběru dat v rodině; může být zavádějící u rozvrstvené populace s heterogenním sběrem dat – méně robustní než segregace; výpovědní hodnota omezená u vzácných variant
patologicko-anatomická charakteristika	potenciálně kvantifikovatelná	predikce na základě běžného patologického popisu nízká, systematické zpracování vyžaduje materiál tumoru; předpokládá, že missense mutace má stejnou charakteristiku jako nonsense mutace
Nepřímé		
fyzikálně-chemické vlastnosti a mezidruhová konzervace	mohou být použity u jakékoli mutace, mohou být vysoce prediktivní	pouze nepřímý vztah k riziku choroby; samostatně nedostatečné ke klasifikaci choroby
funkční	mohou biologicky hodnotit efekt varianty na schopnost proteinu vykonávat některé z klíčových funkcí	testovaná funkce nemusí být ve vztahu k riziku choroby; nutná validace

nemožné. Velmi vzácně je tak možné kategorizovat varianty na základě samotné segregace [10].

Vyšetření kontrolní populace

Vyšetření kontrolní populace může pomoci odhalit neutrální polymorfizmy, které se v populaci vyskytují často (více než v 1 % případů) a nemají vliv na sledované onemocnění. Např. četný výskyt missense záměny p.N372H u 183 ze 476 kontrol nesvědčí pro její možné patogenní působení [7]. Problémem je však nízká frekvence většiny variant (méně než 1 na 1 000). Vedle toho je řada variant specifická pro určitý geografický region, což může komplikovat získání dostatečného množství kontrol [10].

Osobní, rodinná anamnéza a patologická charakteristika nádoru

Předpokládá se, že varianta, která je patogenní, se bude vyskytovat v případech se silnou rodinnou zátěží podobnou takové, jakou známe u patogenních nonsense mutací. Mezi zjišťovaná data patří věk v době diagnózy, počet postižených členů rodiny a jejich věk, přítomnost oboustranného karcinomu či postižení muže v rodině [13].

Nádory nositelů mutací v *BRCA2* mohou vykazovat jisté patologicko-

-anatomické či molekulárně biologické charakteristiky [14]. Za specifický znak je považována tubulární struktura [15]. Jiným parametrem by mohla být ztráta heterozygotnosti (Loss of Heterozygosity – LOH) v místě genu *BRCA2*, která je nalézána v 80 % nádorů s patogenní nonsense mutací [15]. Naopak ztráta alely nesoucí missense variantu mluví proti její patogenitě [15].

Společná přítomnost s jinou patogenní mutací

Bialelické mutace v *BRCA2* vedou k embryonální letalitě či Fanconiho anémii [4,16]. Proto je nepravděpodobné, aby se varianta, která je funkčně významná, vyskytovala společně v pozici trans s jinou patogenní mutací u pacientů, kteří nemají Fanconiho anémii. Stejně tak se dvě patogenní mutace nevyskytují na stejné alele. Z tohoto lze usuzovat, že varianta, která se vyskytuje společně s jinou patogenní mutací, je neutrální (nepatogenní) nebo případně pouze nízkou rizikovou alelu. Např. dříve zmiňovaná varianta p.N372H byla zjištěna v přítomnosti mnoha různých patogenních mutací, což ji opět charakterizuje jako neutrální [7]. Absence jiné patogenní mutace ve druhé alele však neklasifikuje variantu jako patogenní [7,10].

Nepřímé metody

Fyzikálně-chemické rozdíly proteinů a konzervace mezi organizmy

Pomocí speciálně vyvinutých modelů, jako např. Granthamova modelu chemických rozdílů, lze usuzovat na fyzikálně-chemické rozdíly mezi wild-type proteinem a proteinem se záměnou aminokyseliny [17]. Na rozdíl mezi patogenní a neutrální mutací lze usuzovat také z míry mezidruhové konzervace u proteinových homologů v místě sledované varianty [18]. Porovnáním sekvencí genu jiných živočichů (např. myši, slepice, kočky, psa či ryby) nebo i nižších organizmů (např. octomilky nebo kvasinky) lze pozorovat různou míru konzervace napříč živočišnými druhy. Vysoká míra konzervace napovídá o významnosti aminokyseliny. Mutace v částech genu, které nejsou přítomny u nižších živočichů, může ukazovat na jejich nevýznamnost, nelze však vyloučit, že gen získal v průběhu evoluce nové funkce, za které jsou zodpovědné tyto nové části genu [7]. *In silico* analýzu toho typu lze dnes provést pomocí speciálních programů, jako např. Align-GVGD [19]; případný vliv varianty na sestřih mRNA lze predikovat např. pomocí programu Max-EntScan [20].

Kombinace metod

Důležitým aspektem klasifikace variant je integrace výsledků jednotlivých metod.

Tab. 2. Přehled používaných funkčních testů, jejich provedení a hodnocení.

Test	Provedení	Patologický fenotyp
imunofluorescence RAD51	buňky jsou vystaveny poškození DNA (mitomycin, iradiace) a v odstupu 24 hod je provedena imunofluorescence kvantifikující fokusy RAD51 v jádře	absence vzniku fokusů RAD51 v reakci na poškození DNA
homologní rekombinace	buňky obsahující GFP reportér jsou transfekovány plasmidem kódujícím I-Sce enzym; po 72 hod jsou GFP pozitivní buňky (výsledek opravy GFP reportéru pomocí homologní rekombinace) kvantifikovány	nízké množství GFP pozitivních buněk (snížená schopnost homologní rekombinace)
citlivost k agens poškozující DNA	buňky jsou vystaveny poškození DNA (mitomycin, iradiace) a v odstupu cca 6 dnů je hodnoceno jejich přežití	snížené přežívání buněk
amplifikace centrozomů	imunofluorescence po barvení protilátkou proti alfa-centrinu 2	zvýšené množství jader s více centrozomy
chromozomální nestabilita	nativně či po poškození DNA je provedeno vyšetření karyotypu	zvýšené množství radiálních chromozomů a zlomů
nitrobuňčná lokalizace <i>BRCA2</i>	pomocí GFP označeny wild-type či mutovaný <i>BRCA2</i> je transfekován do buněk a následně hodnocena jeho lokalizace pomocí imunofluorescence	lokalizace proteinu v cytoplasmě

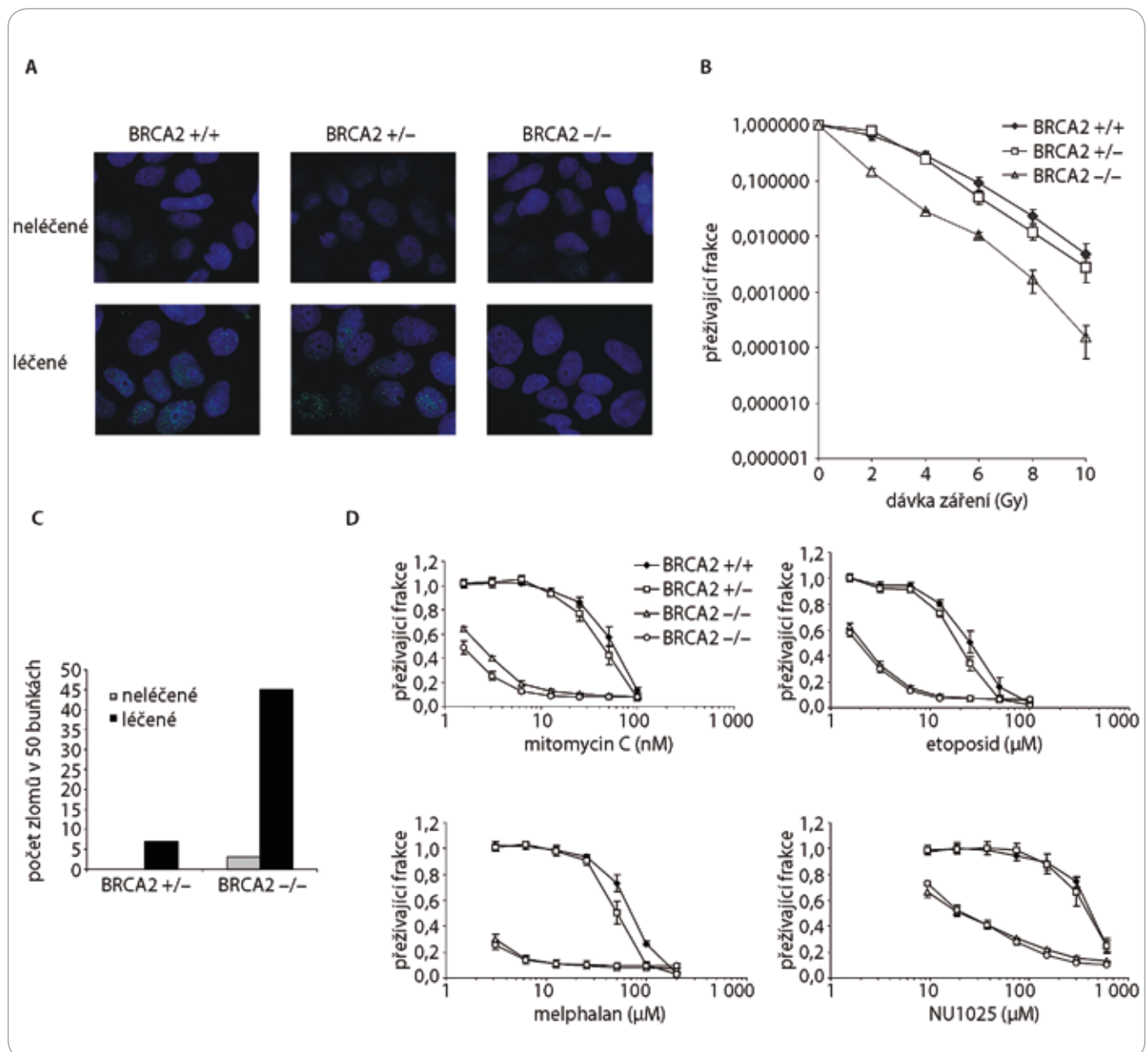
Každá metoda generuje různé výsledky, jejichž vztah není vždy jednoznačně určen. Proto se ukázalo jako vhodné výsledky jednotlivých testů kombinovat. Kombinace více testů vyloučí nadměrnou závislost na jednom typu testu, a představuje tedy také určitý kontrolní mechanismus. Takový multifaktorový algoritmus integrace jednotlivých hodnocení popsal např. Goldgar, který pomocí multifaktoriální analýzy posuzoval segregaci sledované varianty s onemoc-

něním, přítomnost jiné patogenní mutace, stupeň mezidruhové konzervace a závažnost změn fyzikálně-chemických vlastností missense varianty na strukturu proteinu [21]. Jednotlivé výsledky jsou pak zpracovány statistickými metodami, např. podle Bayesova modelu. Původní pravděpodobnost (stanovená na základě *in silico* analýzy) je modifikována pravděpodobnostmi z jednotlivých genetických testů ve výslednou konečnou pravděpodobnost patogenity [10].

K ještě většímu posílení výpovědní hodnoty slouží společné sdílení výsledků, např. formou databáze [22]. Ex-UV databáze sdružuje všechny publikované varianty hodnocené pomocí Bayesova modelu. Výstupním hodnocením je rozdělení variant podle jednotného IARC klasifikačního systému [23].

Funkční testy

Významným omezujícím faktorem genetických testů je dostupnost dostateč-



Obr. 2. Funkční testy BRCA2.

A. Imunofluorescence RAD51 u buněk před a po léčbě mitomycinem C; B. Přežití buněk po expozici gamma záření; C. Chromozomální zlomy u buněk před a po léčbě mitomycinem C; D. Proliferace buněk po expozici různými látkám poškozujícím DNA.

ného množství rodinných příslušníků a kontrolních vzorků ke kompletnímu genetickému vyšetření. V řadě případů proto takové vyšetření není možné v dostatečném rozsahu provést. Jedinou metodou klasifikace variant v *BRCA2* jsou pak nepřímé funkční metody. Jedná se o *in vitro* postupy, při kterých se zjišťuje vliv konkrétní odchylky od referenční sekvence na funkci proteinu. Jejich souhrn je uveden v tab. 2.

Imunofluorescence RAD51

Role *BRCA2* v opravě DNA spočívá v jeho vazbě na protein RAD51 a regulaci vzniku nukleárního filamenta, které je nezbytné pro homologní rekombinaci. Imunofluorescenční detekce fokusů RAD51 proteinu v jádře v reakci na poškození DNA je tak nepřímou známkou *BRCA2* dependentní homologní rekombinace [2,3]. Buňky rostoucí na krycím sklíčku jsou vystaveny působení mitomycinu C či iradiaci (poškození DNA). V krátkém časovém intervalu je provedeno imunofluorescenční vyšetření a kvantifikace buněk s přítomnými fokusy RAD 51 v jádře [3] (obr. 2).

Homologní rekombinace

Pomocí stabilní transfekce je do genomu buněk integrován GFP (Green Fluorescent Protein) konstrukt. V něm jsou dva za sebou uspořádané GFP geny, každý obsahující jinou inaktivující mutaci. Inaktivace v prvním z nich je zároveň štěpícím místem pro enzym *I-SceI*. Po transfekci plazmidem produkujícím enzym *I-SceI* je enzymem vytvořen dvouřetězcový zlom. Expres aktivního GFP je závislá na opravě mutovaného GFP genu homologní rekombinací po vzniku dvouřetězcového zlomu. GFP vykazuje zelenou fluorescenci a detekujeme ho po expozici ultrafialovému světlu ve fluorescenčním mikroskopu. V původní práci byly provedeny experimenty s buňkami CAPAN1 a s myšimi embryonálními buněčnými liniemi [24]. Později byla metoda aplikována na vybrané varianty *BRCA2* u linie VC8 [7].

Citlivost k agens poškozující DNA

Poškození DNA ve formě meziřetězcových křížových vazeb či zlomů dvoj-

vláknů DNA nemůže být *BRCA2*-deficitními buňkami opraveno a vede k jejich zániku [3]. Mezi nejčastěji používaná agens patří alkylační látky jako mitomycin C, melfalan nebo cisplatin, případně inhibitory topoizomeráz, např. etoposid. Obdobného účinku je možné dosáhnout i vystavením buněk iradiaci [3]. Buňky v exponenciální fázi růstu jsou vystaveny působení látky poškozující DNA. Jejich proliferace je hodnocena po dobu několika dnů. Absence funkčního *BRCA2* vede k zániku prakticky všech buněk, buňky s funkčním *BRCA2* umírají pouze při užití vysokých dávek [3,7,25] (obr. 2).

Amplifikace centrozomů

Centrozomy (dělicí tělíska) jsou orgány zajišťující vhodné uspořádání mikrotubulů k buněčnému dělení. *BRCA2*-deficitní buňky v buněčných kulturách i v samotných lidských nádorech vykazují amplifikaci centrozomů. Tento fenotyp je nezávislý na expozici buněk látkám poškozujícím DNA a naznačuje funkci *BRCA2* v buněčném dělení [4,26,27]. Přesný mechanismus jeho vzniku však není znám, dříve předpokládaná role *BRCA2* v cytokinezi nebyla recentně potvrzena [28]. Amplifikaci centrozomů můžeme tedy zatím hodnotit pouze jako marker deficitu *BRCA2*. Míra amplifikace se určuje detekcí centrozomů imunofluorescenčním barvením protilátky proti centrinu [29].

Chromozomová nestabilita

BRCA2-deficitní buňky vykazují chromozomovou nestabilitu, která je ještě zvýrazněna po expozici látkám poškozujícím DNA. Jimi vyvolané chromozomální zlomy slouží jako diagnostický test Fanconiho anémie včetně skupiny FANCD1 způsobené mutacemi v *BRCA2* [1,3]. Zlomy a radiální chromozomy byly nalezeny ve zvýšené míře u *BRCA2*-deficitních buněk [3] (obr. 2). Např. u mutace p.Y3308X ukázal karyotyp 68 takových změn ve srovnání s 10 změnami u kontrol [25].

Nitrobuňčná lokalizace

Nukleární lokalizační systém (NLS) se nachází na samém konci genu *BRCA2* a většina mutací, které způsobují před-

časnou terminaci translace, je tak lokalizována před ním. V experimentech Wu et al byl wild-type *BRCA2* protein lokalizován především v jádře ve srovnání s patogenní mutací c.6174delT, u které je mutovaný protein lokalizován v cytoplazmě. Ektopická exprese mutovaného proteinu v cytoplazmě byla rovněž pozorována u mutací c.8395G>C a c.8204G>A, jejichž předpokládaným důsledkem jsou aminokyselinové změny p.D2723H a p.R2659K. Avšak v případě nepatogenní varianty byl p.T2515I protein lokalizován překvapivě v cytoplazmě i jádře [7]. Metoda se provádí pomocí detekce fluorescenčně značeného proteinu připojeného k exogenně transiентně exprimovaným variantám *BRCA2*.

Buněčné modely

Při interpretaci funkčních testů je nutné brát ohled na buněčný model, který byl k danému testu použit. Buněčné modely ke studiu funkce genu *BRCA2* jsou vzácné a obtížně získatelné. Hlavním důvodem je esenciální funkce genu pro udržení neporušeného genomu, a tedy života buňky. Indukovaná ztráta genu je tak často pro buňky letální. Na rozdíl od jiných genů existuje jen jedna buněčná nádorová linie s přirozeně se vyskytující mutací v *BRCA2*: linie karcinomu pankreatu CAPAN1 (kromě od FANCD1 pacientů odvozených linií leukemických buněk FA-AML1 a SB1690, fibroblastů EUFA423 a lymfoblastů HSC62) [4,30].

Pro funkční hodnocení variant lze použít *BRCA2*-deficitních či proficitních buněčných linií. V obou případech jsou testy závislé na ektopické expresi konstruktů obsahující *BRCA2* s mutací (plazmid, arteficiální chromozom), které jsou transiентně či stabilně transfekované do buněk. V prvním případě sledujeme, zda je varianta po transfekci mutovaného konstruktů schopna opravit deficitní fenotyp parenterálních buněk. Ve druhém případě jsou použity proficitní buňky, jejichž wild-type fenotyp je srovnáván s fenotypem mutovanými konstrukty transfekovaných buněk. V tomto případě se předpokládá dominantně-negativní efekt patogenních mutací. Vzhledem k délce sekvence *BRCA2* se v některých

případech používají dokonce pouze partiální sekvence *BRCA2* genu.

Proficovní buňky

K funkčnímu testování variant *BRCA2* byly použity buňky HeLa (karcinom děložního čípku) či buňky HEK 293T (transformované embryonální renální buňky) [7]. Wu a později Farrugia použili buňky HEK 293T k testování amplifikace centrozomů. Po transienční transfekci mutovaných konstruktů ukazoval vzestup procentuelního zastoupení buněk s amplifikací centrozomů (více než 4) na funkční významnost varianty. K potvrzení spolehlivosti testu však autoři přece jen použili také deficitní buňky VC8, kde byla naopak patrná perzistence vysokého procenta buněk s amplifikací centrozomů po transfekci konstruktů nesoucích patogenní mutace [7,29].

Nedávno byla provedena studie zkoumající vliv overexpresie 15 variant genu *BRCA2* transfekovaných do HeLaG1 buněk. Tato buněčná linie umožňuje měřit spontánní homologní rekombinaci mezi dvěma odlišně mutovanými geny pro rezistenci na hygromycin (HygR), kdy frekvence rekombinace je stanovena jako počet rezistentních klonů. Autoři hodnotili vzestup spontánní homologní rekombinace jako známku patogenicity [31].

Deficitní buňky

CAPAN1 je jediná deficitní přirozeně se vyskytující solidní nádorová buněčná linie. Její buňky rostou pomalu a jsou špatně transfekabilní. Jedinou isogenní kontrolou jsou buňky CAPAN1 s exogenní overexpresí *BRCA2*. Tyto buňky však rostou ještě pomaleji, což může být způsobeno nefyziologickými hladinami exprese *BRCA2* [16,32].

Jinou možností je vytvoření buněčných linií s indukovaným defektem *BRCA2* a pomocí plasmidu nebo umělého chromozomu docílit ektopické tvorby mutovaného nebo wild-type proteinu. Nejznámějším příkladem je buněčná linie VC8 odvozená z křeččích rakovinných buněk V79 náhodnou chemickou mutagenézí. Tyto buňky nesou v 15. a 16. exonu genu *XRCC11* (homolog *BRCA2*) mutaci předčasně ukončující

syntézu proteinu [26]. Docílení stabilní exprese ektopického *BRCA2* je možné, může být však obtížné. Wu et al tuto linii pro funkční testy *BRCA2* variant použili jako první: testovali devět neznámých variant společně s jedním polymorfismem a jednou patogenní mutací. K funkčnímu hodnocení modelu použili test homologní rekombinace, citlivost vůči mitomycinu C a amplifikaci centrozomů. Sledovali rovněž nitrobuněčnou lokalizaci proteinů. V kombinaci s integrovaným multifaktoriálním pravděpodobnostním poměrem pak identifikovali dvě mutace s patogenním fenotypem, pět variant s neutrálním fenotypem a dvě varianty, jejichž fenotyp nebyl jednoznačný [7]. Celkem 22 missense mutací testovali stejní autoři pomocí dvou funkčních testů, testu homologní rekombinace a amplifikace centrozomů. U 13 variant prokázali ztrátu funkce v alespoň jednom testu, u dvou prokázali aberantní sestřih a u sedmi variant byla funkce zachována. Důležitá byla vysoká korelace výsledků funkčních testů s genetickými pravděpodobnostními modely [29].

Další použitou buněčnou linií jsou myši embryonální kmenové buňky. V těchto buňkách je jedna alela *BRCA2* genu inaktivována v místě exonu 11, druhou lze inaktivovat po expresi Cre rekombinázy. Tato situace vede k úmrtí všech buněk. Dodání exogenního lidského *BRCA2* formou bakteriálního arteficiálního chromozomu však dokáže odumření zabránit. Na patogenitu variant se tak usuzuje dle jejich možnosti zabránit letalitě buněk s nepřítomným endogenním *BRCA2*. V případě, že varianty vede k přežití určitého množství klonů (hypomorfní fenotyp), jsou tyto klony podrobeny funkčním testům (homologní rekombinace, přežití po expozici látek poškozujících DNA, karyotyp, imunofluorescence RAD51). Tímto buněčným systémem bylo otestováno celkem 17 variant [25].

Problémy buněčných modelů

Používané buněčné modely jsou zatíženy řadou problémů. Využívají často jiné než lidské buňky. Hodnotíme tak jedinečné a citlivé funkce esenciálního

proteinu v prostředí jiného živočišného druhu. Funkce, které se za normálních okolností odehrávají v nádorových buňkách, dokonce hodnotíme v nenádorových buňkách. Pomalý růst, obtížná transfekabilita, omezená doba přežívání či dokonce letalita *BRCA2*-deficitních buněk komplikují použití současných linií. Dalším problémem prakticky u všech modelů je nutnost exogenního dodání *BRCA2* ve formě plasmidů či arteficiálních chromozomů. Míru exprese pak nelze kontrolovat a může být zcela nefyziologická. Dokonce je často pouze transienční. Experimenty využívající overexpresi jsou nesmírně citlivé a vyžadují mimořádné kontroly. Jiným problémem je užití pouze partiálních proteinů v některých studiích. Takové použití nelze považovat za dostatečné a může vést k chybným závěrům [3,25,32].

Vlastní model

Ve snaze vyhnout se některým nevýhodám doposud dostupných buněčných modelů jsme vytvořili vlastní model *BRCA2* deficiencie. V nádorové buněčné linii DLD1 jsme pomocí homologní rekombinace vytvořili delecí části exonu 11 v hemizygotním a dále i homozygotním stavu. Tyto *BRCA2*^{Δex11/Δex11} linie jsou i s homozygotní delecí v místě exonu 11 životaschopné a mají, na rozdíl od svých hemizygotních parenterálních buněk, typický fenotyp *BRCA2* deficiencie [3].

V případě použití hemizygotních buněk s jednou deletovanou alelou *BRCA2*^{Δex11/wt} lze vnesením mutace do druhé alely hodnotit její funkční význam. Takový model nejbližší napodobuje stav v samotném nádoru. Iniciálně jsme vytvořili knihovnu sedmi mutací (*BRCA2*^{Δex11/mut}) a hodnotili jejich funkční význam. K hodnocení funkce jsme použili dvě metody, imunofluorescenci RAD51 a přežití buněk po expozici mitomycinu C [3] (obr. 2).

Vedle hodnocení variant lze tento model použít i k hodnocení funkce jednotlivých proteinových reziduí. Nedávné studie s použitím partiálních proteinů ukázaly závislost buněk na fosforylaci serinu cyklin-dependentními kinázami v místě 3 291 [33]. Po náhradě serinu v této pozici glutamá-

tem (imituje konstitutivní fosforylaci) a alaninem (znemožňuje fosforylaci) jsme potvrdili, že fosforylace v tomto místě inhibuje vazbu proteinu RAD51, nicméně tato fosforylace nebyla pro buňku nezbytná [3].

Po získání iniciálních výsledků jsme se rozhodli aplikovat naši techniku v klinické praxi. Ve spolupráci s laboratoří Oddělení genetiky a epidemiologie nádorů Masarykova onkologického ústavu jsme zahájili funkční testování variant nejasného významu nalezených v reálných rizikových rodinách vyšetřených v této laboratoři. V našich experimentech provádíme funkční vyšetření všech missense mutací nalezených v exonu 18. Dosavadní výsledky ukazují na dobrou klinickou využitelnost našeho modelu k testování variant (doposud nepublikované výsledky).

Interpretace výsledků

Provedení funkčního testu vyžaduje jeho správnou interpretaci. Funkční testy by měly být vždy provedeny s dostatečnými kontrolami, k jejichž známému fenotypu je testovaná varianta porovnána, optimální je použití missense varianty s patogenním fenotypem. Buněčné modely spoléhající na overexpresi *BRCA2* genu nelze považovat za optimální.

Vždy by měl být proveden více než jeden test, neboť výsledky dvou různých funkčních testů mohou být odlišné. Missense varianty p.R3025W a p.R2784W byly testovány pomocí amplifikace centrozomů a testu homologní rekombinace. Ani jedna z variant nevedla k indukci amplifikace centrozomů, obě však ukázaly redukovanou aktivitu homologní rekombinace [29]. Přestože amplifikace centrozomů je konstantním nálezem u *BRCA2*-deficentních buněk, mechanismus jejího vzniku není znám. Dříve předpokládaný podíl *BRCA2* při cytokinezi byl recentně zpochybněn [28]. Senzitivita testu amplifikace centrozomů může být nízká, nelze však také vyloučit různé nezávislé funkce genu *BRCA2* testované těmito dvěma metodami, z nichž jedna je zachována a druhá ztracena.

Funkční testy provádíme za předpokladu, že jejich abnormální nález zna-

mená, že varianta ovlivňuje u pacienta vznik nádorového onemocnění. Na rozdíl od genetických testů, jako např. testu segregace varianty s chorobou, nelze v současné době u většiny variant tento vztah na základě patologického funkčního testu jednoznačně potvrdit. Výhodou v určení tohoto vztahu je kombinace genetických a funkčních testů. Tato kombinace umožňuje určení senzitivity a specifity funkčních testů [29]. Pouze silná konkordance mezi výsledky genetických a funkčních testů může náš předpoklad definitivně potvrdit. Tato validace však může být provedena pouze u variant, u kterých jsou k dispozici i genetická data.

Vzhledem k náročnosti všech používaných metod a nízké četnosti jednotlivých variant jsou velkým příslibem aktivity typu ENIGMA. Jedná se o mezinárodní iniciativu sdružující výzkumné týmy za účelem sdílení dat a optimalizace určování významu variant v *BRCA1* a *BRCA2* genu [34].

Závěr

Výsledkem genetického vyšetření *BRCA2* genu je často nalezení genetické varianty, která nevede k zástavě tvorby proteinu, ale pouze k záměně jedné z aminokyselin. Genetické studie mají omezenou účinnost v určení patogenity těchto variant a často nejsou pro nedostatek potřebných údajů proveditelné. Funkční testy dokáží odlišit známé patogenní varianty, jejich limitací je zatím nedostatečná validace vztahu mezi výsledkem funkčního testu a rizikem vzniku nádorového onemocnění. Představují však velký potenciál pro klinickou praxi.

Literatura

- Hucl T, Gallmeier E. DNA repair: exploiting the Fanconi anemia pathway as a potential therapeutic target. *Physiol Res* 2011; 60(3): 453–465.
- Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of *BRCA1* and *BRCA2*. *Cell* 2002; 108(2): 171–182.
- Hucl T, Rago C, Gallmeier E et al. A syngeneic variance library for functional annotation of human variation: application to *BRCA2*. *Cancer Res* 2008; 68(13): 5023–5030.
- Howlett NG, Taniguchi T, Olson S et al. Biallelic inactivation of *BRCA2* in Fanconi anemia. *Science* 2002; 297(5581): 606–609.
- Ford D, Easton DF, Stratton M et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998; 62(3): 676–689.

- Foretova L, Petrakova K, Palacova M et al. Genetic testing and prevention of hereditary cancer at the MM-CI-over 10 years of experience. *Klin Onkol* 2010; 23(6): 388–400.
- Wu K, Hinson SR, Ohashi A et al. Functional evaluation and cancer risk assessment of *BRCA2* unclassified variants. *Cancer Res* 2005; 65(2): 417–426.
- Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I et al. *BRCA2* germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(3): 214–221.
- Foretova L, Navratilova M, Machackova E. Limitations of genetic testing in oncology. *Klin Onkol* 2009; 22 (Suppl): S65–S68.
- Goldgar DE, Easton DF, Byrnes GB et al. Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Hum Mutat* 2008; 29(11): 1265–1272.
- Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE et al. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2*: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol* 2002; 20(6): 1480–1490.
- Thompson D, Easton DF, Goldgar DE. A full-likelihood method for the evaluation of causality of sequence variants from family data. *Am J Hum Genet* 2003; 73(3): 652–655.
- Easton DF, Deffenbaugh AM, Pruss D et al. A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the *BRCA1* and *BRCA2* breast cancer-predisposition genes. *Am J Hum Genet* 2007; 81(5): 873–883.
- Hofstra RM, Spurdle AB, Eccles D et al. Tumor characteristics as an analytic tool for classifying genetic variants of uncertain clinical significance. *Hum Mutat* 2008; 29(11): 1292–1303.
- Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S et al. Genetic and histopathologic evaluation of *BRCA1* and *BRCA2* DNA sequence variants of unknown clinical significance. *Cancer Res* 2006; 66(4): 2019–2027.
- Gallmeier E, Hucl T, Calhoun ES et al. Gene-specific selection against experimental fanconi anemia gene inactivation in human cancer. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(5): 654–660.
- Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 1974; 185(4154): 862–864.
- Jukes TH, King JL. Deleterious mutations and neutral substitutions. *Nature* 1971; 231(5298): 114–115.
- Tavtigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE et al. Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Hum Mutat* 2008; 29(11): 1342–1354.
- Yeo G, Hoon S, Venkatesh B et al. Variation in sequence and organization of splicing regulatory elements in vertebrate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(44): 15700–15705.
- Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM et al. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to *BRCA1* and *BRCA2*. *Am J Hum Genet* 2004; 75(4): 535–544.
- Vallée MP, Francy TC, Judkins MK et al. Classification of missense substitutions in the *BRCA* genes: a database dedicated to Ex-UVs. *Hum Mutat* 2012; 33(1): 22–28.
- Plon SE, Eccles DM, Easton D et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 2008; 29(11): 1282–1291.
- Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. *BRCA2* is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* 2001; 7(2): 263–272.
- Kuznetsov SG, Liu P, Sharan SK. Mouse embryonic stem cell-based functional assay to evaluate mutations in *BRCA2*. *Nat Med* 2008; 14(8): 875–881.

26. Kraakman-van der Zwet M, Overkamp WJ, van Lange RE et al. *BRCA2* (XRCC11) deficiency results in radiore-sistant DNA synthesis and a higher frequency of sponta-neous deletions. *Mol Cell Biol* 2002; 22(2): 669–679.
27. Tutt A, Gabriel A, Bertwistle D et al. Absence of *BRCA2* causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Curr Biol* 1999; 9(19): 1107–1110.
28. Lekomtsev S, Guizetti J, Pozniakovsky A et al. Evidence that the tumor-suppressor protein *BRCA2* does not regu-late cytokinesis in human cells. *J Cell Sci* 2010; 123 (Pt 9): 1395–1400.
29. Farrugia DJ, Agarwal MK, Pankratz VS et al. Func-tional assays for classification of *BRCA2* variants of uncertain significance. *Cancer Res* 2008; 68(9): 3523–3531.
30. Gallmeier E, Kern SE. Absence of specific cell killing of the *BRCA2*-deficient human cancer cell line CAPAN1 by poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(7): 703–706.
31. Balia C, Galli A, Caligo MA. Effect of the overexpression of *BRCA2* unclassified missense variants on spontaneous homologous recombination in human cells. *Breast Can-cer Res Treat* 2011; 129(3): 1001–1009.
32. Gallmeier E, Kern SE. Targeting Fanconi anemia/*BRCA2* pathway defects in cancer: the significance of preclinical pharmacogenomic models. *Clin Cancer Res* 2007; 13(1): 4–10.
33. Esashi F, Christ N, Gannon J et al. CDK-dependent phosphorylation of *BRCA2* as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 2005; 434(7033): 598–604.
34. Spurdle AB, Healey S, Devereau A et al. ENIGMA – evi-dence-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* 2012; 33(1): 2–7.