

BRCA1/2 patogén és ismeretlen  
klinikai szignifikanciájú variánsok  
azonosítása és vizsgálati lehetőségei

Ph.D. értekezés

**Gráf Alexandra**

Témavezetők: Dr. Haracska Lajos

Dr. Kiss Ernő

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2022.

# 1. Tartalomjegyzék

<b>1. TARTALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>2</b>
<b>2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
<b>3. BEVEZETÉS .....</b>	<b>6</b>
3.1. A TUMOREVOLÚCIÓ MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI ALAPJAI .....	6
3.2. A BRCA1/2 FELÉPÍTÉSE.....	7
3.3. GENOMSTABILITÁS ÉS A BRCA FEHÉRJÉK SZEREPE ANNAK FENNTARTÁSÁBAN .....	8
3.4. A BRCA1/2 VEZETTE TUMOREVOLÚCIÓ .....	14
3.5. A BRCA GÉNEKHEZ KÖTHETŐ DAGANATOS MEGBETEGEDÉSEK .....	16
3.6. A BRCA GÉNEK MUTÁCIÓI .....	17
3.7. A BRCA1/2 DIAGNOSZTIKA .....	18
3.8. A BRCA1 BRCT DOMÉNT ÉRINTŐ VUS MUTÁCIÓINAK FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATI LEHETŐSÉGEI .....	19
<b>4. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>23</b>
<b>5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>25</b>
5.1. TÁPOLDATOK .....	25
5.2. ANTIBIOTIKUMOK ÉS SZELEKCIÓS REAGENSEK .....	25
5.3. ELLENANYAG .....	25
5.4. ALAP OLDATOK .....	26
5.5. OLIGÓK ÉS EGYÉB OLIGONUKLEOTIDOK .....	26
5.6. PLAZMIDOK .....	27
5.7. BAKTÉRIUMTÖRZSEK .....	28
5.8. ÉLESZTŐTÖRZS .....	28
5.9. A KÍSÉRLETEK SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK.....	28
5.9.1. Restriktív endonukleázal történő emésztés .....	28
5.9.2. Fragment izolálása agaróz gélből.....	29
5.9.3. A BRCA1 variánsok előállítása: mutagén PCR, a klónozás további lépései.....	29
5.9.4. Ligálás.....	30
5.9.5. LR reakció .....	30
5.9.6. Baktériumsejtek kémiai transzformációja és elektroporációja.....	30
5.9.7. Élesztősejtek transzformációja .....	30
5.9.8. A BRCA1 variánsok klónozása expressziós vektorba.....	31
5.9.9. Plazmid tisztítás baktériumsejtekből .....	31
5.9.10. A mutációk azonosítása betegekből származó tumorszövet mintákból.....	31
5.9.11. Genomi DNS izolációja a BRCA2 mutációt hordozó beteg szövetmintáiból.....	31
5.9.12. Western blot .....	31
5.9.13. Az élesztő kolóniák mérése .....	32

5.9.14.	<i>A BRCA2 c.7795G&gt;T mutációt hordozó beteg kórtörténete</i> .....	32
5.9.15.	<i>A vizsgált BRCA2 régió amplifikációja és szekvenálása</i> .....	32
5.9.16.	<i>Az indexelt ampliconok szekvenálása</i> .....	34
5.9.17.	<i>Az újgenerációs szekvenálás eredményének kiértékelése</i> .....	34
5.9.18.	<i>Bioinformatikai analízis</i> .....	34
<b>6.</b>	<b>EREDMÉNYEK</b> .....	<b>35</b>
6.1.	<i>A MUTÁCIÓK AZONOSÍTÁSA DAGANATOS BETEGEKBŐL SZÁRMAZÓ SZÖVETMINTÁKBAN</i> .....	35
6.2.	<i>AZ AZONOSÍTOTT PATOGÉN BRCA2 MUTÁCIÓ VIZSGÁLATA</i> .....	37
6.2.1.	<i>A BRCA2 c.7795G&gt;T mutáció vizsgálata a beteg tumoros és egészséges szövetblokkjaiban</i> .....	37
6.2.2.	<i>A BRCA2 c.7795G&gt;T mutáció vizsgálata a beteg tumoros és egészséges szövetmintáinak egyedi sejtjein és sejtklaszterein</i> .....	39
6.2.3.	<i>A különböző szövetminta típusok amplifikálhatósága és szekvenálhatósága</i> .....	44
6.2.4.	<i>A szövetblokk és egyedi sejt/sejtklaszter szekvenálás eredményének összehasonlítása</i> .....	45
6.3.	<i>AZ ISMERETLEN KLINIKAI SZIGNIFIKANCIÁJÚ BRCA1 VARIÁNSOK VIZSGÁLATA</i> .....	45
6.3.1.	<i>Az ismeretlen klinikai szignifikanciájú BRCA1 variánsok vizsgálata bioinformatikai analízis segítségével</i> .....	45
6.3.2.	<i>A BRCA1 VUS mutációkat hordozó plazmid konstrukciók előállítása</i> .....	47
6.3.3.	<i>A BRCA1 VUS variánsok expressziójának vizsgálata élesztő sejtekben</i> .....	49
6.3.4.	<i>A BRCA1 VUS variánsok hatása a kolóniaméretre S. cerevisiae-ben</i> .....	50
<b>7.</b>	<b>DISZKUSSZIÓ</b> .....	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ</b> .....	<b>59</b>
<b>9.</b>	<b>SUMMARY OF THE THESIS</b> .....	<b>64</b>
<b>10.</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>68</b>
<b>11.</b>	<b>SAJÁT KÖZLEMÉNYEK</b> .....	<b>69</b>
<b>12.</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>71</b>

## 2. Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Feloldás
as	aminosav
BRCA1/2	BReast CAncer susceptibility gene 1/2
BARD1	BRCA1 Associated RING Domain 1
bp	bázispár
BRC repeat	BRCA2 repeat
BRCT	BRCA1 C-Terminal (domain)
CC	Coiled-Coil (domain)
CHK1	CHeckpoint Kinase 1
CtIP	C-terminal binding protein Interacting Protein 1
DDR	DNA Damage Response
dsDNS	(double stranded) kétszálú DNS
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
HBOCS	Hereditary Breast and Ovary Cancer Syndrome
HR	Homologous Recombination
kDa	kilodalton
LOH	Loss Of Heterozigosity
MRN komplex	Mre11, Rad50, Nbs1 complex
Mre11	Meiotic Recombination 11
Nbs1	Nijmegen Breakage Syndrome 1
NHEJ	NonHomologous End-Joining
NGS	Next Generation Sequencing
PALB2	Partner And Localizer of BRCA2
Rad50	RADiation sensitive protein 50
Rad51	RADiation sensitive protein 51
RAP80	Receptor-Associated Protein 80
RING	Really Interesting New Gene
VUS	Variant of Uncertain Significance
SCPA	Small Colony Phenotype Assay

<b>Rövidítés</b>	<b>Feloldás</b>
ssDNS	(single stranded) egyszálú DNS
53BP1	p53 Binding Protein 1

### 3. Bevezetés

#### 3.1. A tumorevolúció molekuláris biológiai alapjai

A daganatos megbetegedések világszerte a vezető halálokok közé tartoznak <sup>1</sup>. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) becslései alapján 2019-ben a világ 183 országából 112-ben daganatos megbetegedések álltak a vezető halálokok listájának első, vagy második helyén. A rák, mint betegség, genetikai eredetű. A sejtek klonális expansiójáért és a daganatok kialakulásáért a genetikai állományban végbemenő változások felelősek. A daganat kialakulása és fejlődése, a tumorigenezis folyamata, hasonlóan a darwini természetes szelekcióhoz, egy evolúciós folyamat, melyet a szomatikus sejtekben végbemenő mutációk irányítanak sorozatos, szubklonális szelekcióval <sup>2</sup>.

A daganatok kialakulása szempontjából három géncsoport tagjaira fokozott figyelem összpontosul, ezek az onkogének, a tumorszupresszorok és a DNS hibajavításban résztvevő gének. Ezeket driver géneknek, azon mutációikat, melyek szelektív előnyt biztosítanak a sejt számára, driver mutációknak nevezzük. A szakirodalomban sokszor a DNS hibajavításban résztvevő, daganatok kialakulásához kapcsolt géneket és a tumorszupresszor géneket egy csoportként kezelik, eszerint 54 onkogén és 71 tumorszupresszor ismert. Az onkogének aktiváló mutációi, míg a tumorszupresszorok és a DNS hibajavításban résztvevő gének inaktíváló mutációi járulnak hozzá a daganatos elváltozások kialakulásához <sup>3</sup>. A DNS hibajavításban résztvevő gének részleges vagy teljes funkcióvesztésének hatására genom szerte megnő a kialakuló mutációk száma. Ezek a mutációk azonban, ellentétben az onkogének és tumorszupresszorok mutációival, nem közvetlen hatást gyakorolnak a sejtburjánzásra <sup>4</sup>. Az úgynevezett passenger mutációk nem biztosítanak szelektív előnyt a daganatsejtek számára <sup>5</sup>, ezek a rögzült módosulások véletlenszerűen, vagy a sejtben megjelenő driver mutáció következményeként jönnek létre.

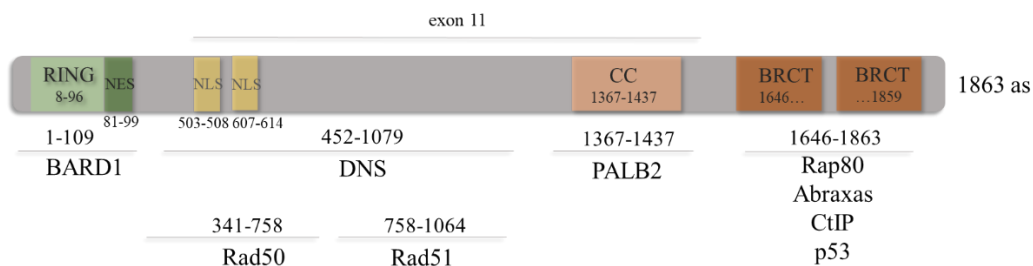
Daganatonként átlagosan 2-8 driver mutáció azonosítható <sup>5</sup>. Mindegyik csoport mutációi megjelenhetnek a csírvonalban, amely öröklődő rákhajlamhoz vezet, illetve megjelenhetnek a szomatikus sejtekben is, melynek az eredménye sporadikus daganat kialakulása lehet. Minden, a DNS szekvenciát érintő változás mutációnak minősül, legyen az pontmutáció, kisebb-nagyobb inszerció vagy delécio (indel), vagy akár nagy kromoszóma átrendeződés. A csírvonal mutációk elsősorban pontmutációk és rövid indelek, míg a tumorsejtekben minden mutációtípus fellelhető <sup>3</sup>.

A tumorokban jelenlévő driver mutációk azonosítása rendkívül fontos a hatékony, személyre szabott daganatterápiához, a megfelelő kezelés kiválasztásához. Mind a BRCA1, mind pedig a BRCA2 tumorszupresszor gén, az emlő és petefészek daganatok legfontosabb driver génjei közé tartozik, így az ezeket a géneket érintő mutációk feltérképezése rendkívül fontos a kezelés, valamint a prevenció céljából.

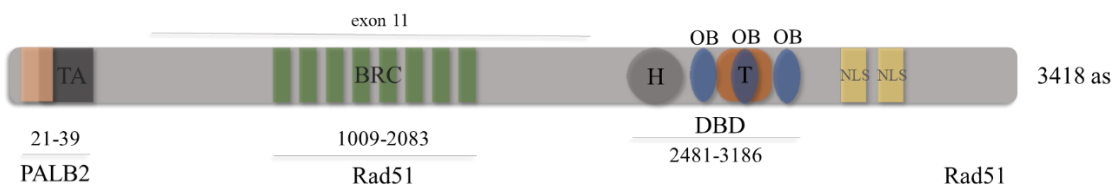
### 3.2. A BRCA1/2 felépítése

A BRCA1 és BRCA2 fehérjék DNS szekvenciájuk szintjén ugyan nem mutatnak hasonlóságot, azonban számos párhuzam vonható a fehérjék tulajdonságaiban, illetve funkcióiban. Mindkét kódoló gén hosszú, több, mint 80 kilobázis; mindkettő extrém hosszú centrális exonnal rendelkezik, amely a kifejeződő fehérje több, mint 50%-át kódolja, valamint mindkét gén nagy fehérjét kódol (BRCA1: 220 kDa, BRCA2: 390 kDa).

#### BRCA1



#### BRCA2



1.ábra: A humán BRCA1 és BRCA2 funkcionális doménjei és a fehérjék főbb interakciós partnerei.

A BRCA1 fehérje 1863 aminosavból épül fel <sup>6</sup>, génje a 17-es kromoszómán (17q21) található <sup>7</sup>. A BRCA1 fehérje N-terminálisán egy RING (Really Interesting New Gene) domén található (1. ábra), mely E3 ubikvitin ligáz aktivitással rendelkezik. Az E3 aktivitás fokozódik, amennyiben a BRCA1 köti a BARD1 fehérjét <sup>8</sup>. A BRCA1 és a BARD1 heterodimert alkotnak. K48-kapcsolt ubikvitin láncok kialakulását képes katalizálni, ezen keresztül a BRCA1 részt vesz a fehérjék proteaszóma általi lebontásának folyamatában, emellett nem konvencionális K6 kapcsolt poliubikvitin láncok kialakítására is képesek, mely többek között a BRCA1 E3 aktivitásának stabilizálásáért

felelős, tehát nem degradációs szignál. A BRCA1-BARD1 komplex felel a hiszton oktamer elemei (H2A, H2B, H3, H4), a DNS sérülés rezponzív H2AX hiszton variáns, valamint a  $\gamma$ -tubulin monoubikvitinációjáért, melyen keresztül szabályozó szerepet tölt be <sup>9,10</sup>. Az N-terminálison nukleáris export szignál (NES) szekvencia is található. Az elsősorban magi lokalizációjú fehérje sejtmagban maradását a BARD1 fehérje kötése biztosítja, mivel ez az interakció elfedi a BRCA1 fehérjén található NES szignált <sup>11</sup>. A fehérje C-terminálisán két, tandem BRCT (BRCA1 C-terminal domain) domén helyezkedik el. Ez a domén számos más, hibajavításban résztvevő fehérjében is megtalálható, szerepe az SXXF<sup>a</sup> motívumot tartalmazó és a szerinen foszforilált fehérjék kötésében van <sup>12</sup>. A BRCA1 fehérje centrális részét a 11-13-as exonok kódolják. Ez a régió magi lokalizációs szignált (NLS) hordoz, aminek köszönhetően a fehérje elsősorban a sejtmagban található. Emellett a BRCA1 központi része egy CC (Coiled-coil) domént is hordoz, ami fontos szerepet játszik a PALB2-n keresztül történő BRCA2 interakcióban <sup>13</sup>.

A BRCA2 gén és az általa kódolt fehérje is (1. ábra) nagyobb, mint a BRCA1, 3418 aminosavból áll <sup>6</sup>, kódoló génje a 13-as kromoszómán található (13q12-13) <sup>14</sup>. A BRCA2 N-terminálisán egy transzkripció aktivációs domént (TAD) hordoz. Centrális részén, melyet a 11-es exon kódol, 8 konzervált BRC ismétlődés található, melyek a Rad51 kötésért felelősek <sup>15</sup>. A C-terminálison található DNS-kötő domén- amely egy helikális doménből, három oligonukleotid-kötő (OB) redőből és egy Tower doménből (T) áll- teszi lehetővé a BRCA2 számára mind az egyesszálú (ssDNS), mind a kettősszálú DNS (dsDNS) kötését <sup>16</sup>. Továbbá a C-terminálisán található a BRCA2 két NLS szignálja is <sup>17</sup>.

### 3.3. Genomstabilitás és a BRCA fehérjék szerepe annak fenntartásában

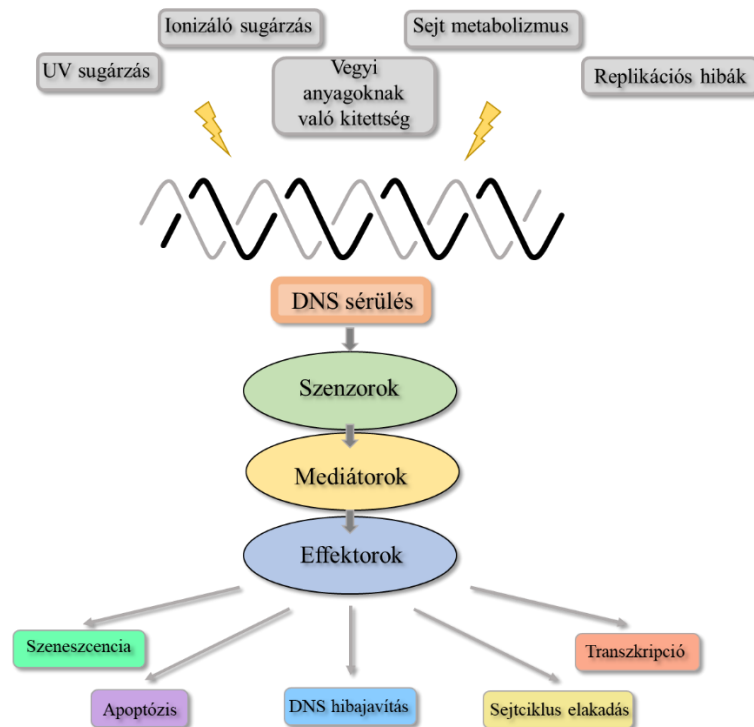
DNS sérülések folyamatosan keletkeznek sejteinkben az azokat érő külső és belső károsító ágensek hatására. Ezek kivédése és a genom stabilitásának megőrzése érdekében fejlődött ki többek között egy komplex, számos egymástól függő- és független jelátviteli útvonalat magába foglaló gépezet, a DNS sérülésre adott válasz (DDR-DNA damage response). A DDR-ben fehérjék összetett hálózata vesz részt, amelyek felelősek a különböző DNS sérüléstípusok felismeréséért és az arra adott válaszreakcióért. Specifikus szabályozó útvonalakat foglal magában, melyek közreműködnek többek

---

<sup>a</sup> Az X bármely aminosavat jelölheti

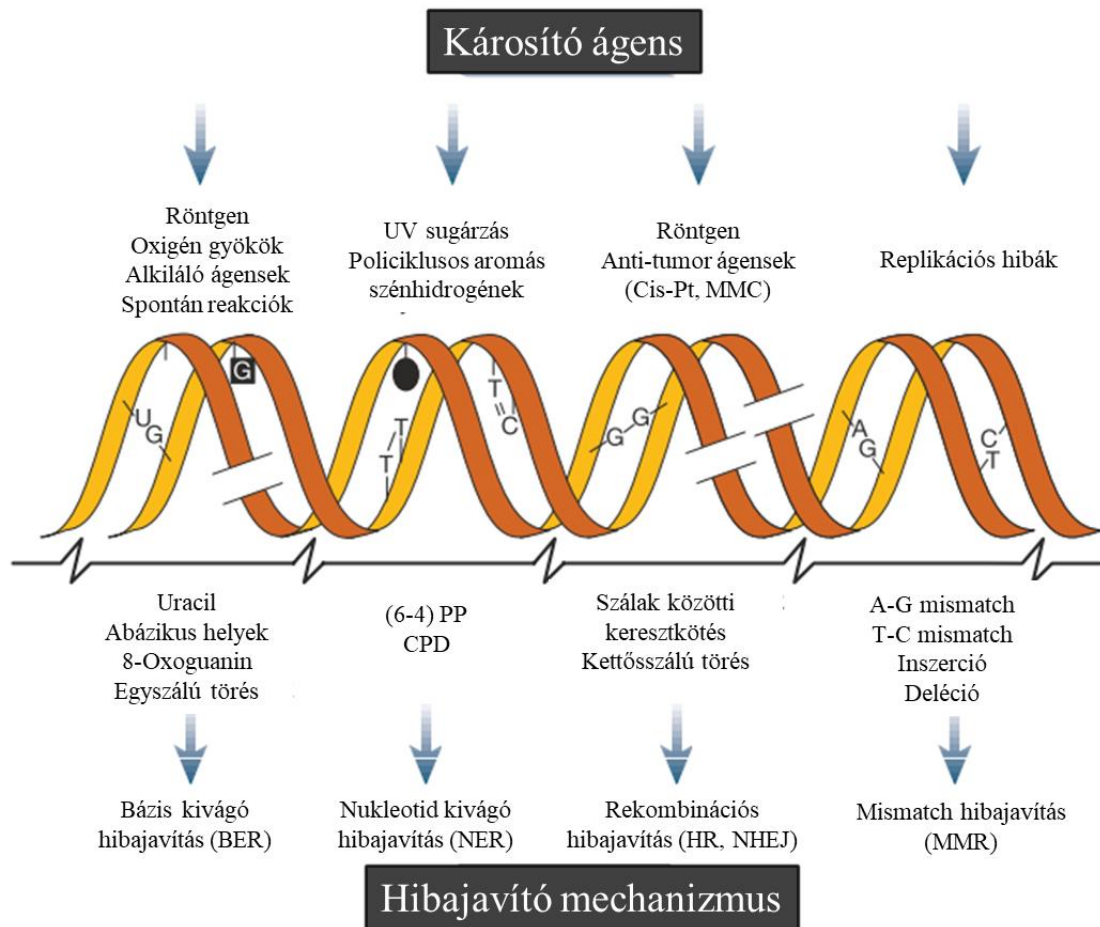


között a DNS hibajavításban, a sejtciklus szabályozásban, a replikációs stresszre adott válaszreakcióban és az apoptózisban <sup>18</sup> is (2. ábra).



2. ábra: A DNS sérülésre adott válasz (DDR). A genomstabilitás megőrzése érdekében kialakult komplex jelátviteli útvonal hálózat. A DDR résztvevői felelősek a DNS sérülések felismeréséért és az arra adott válaszreakcióért. A DDR szabályozó útvonalai többek között részt vesznek a DNS hibajavításban, a sejtciklus és a transzkripció szabályozásában, valamint a programozott sejthalál folyamatában.

A különböző típusú DNS sérülések javításáért különböző hibajavító útvonalak, illetve független hibajavító fehérjék felelősek (3. ábra). A legalapvetőbb, a DNS egyik szálát érintő hibajavító útvonalak a nukleotid kivágó hibajavítás (NER), mely a DNS kettős hélix szerkezetet roncsoló sérülések javításáért felel, valamint a bázis kivágó hibajavítás (BER), amely a bázisok kisebb, kémiai módosulásait javítja ki. A hibajavításhoz szükséges templát DNS az intakt komplementer szál. Két további, alapvető hibajavító útvonal a DNS kettősszálú törésének kijavításában (DSBR-Double stranded break repair) játszik szerepet, ezek a homológ rekombináció (HR-Homologous recombination) és a nem homológ végek összeillesztése (NHEJ-Nonhomologous end-joining).



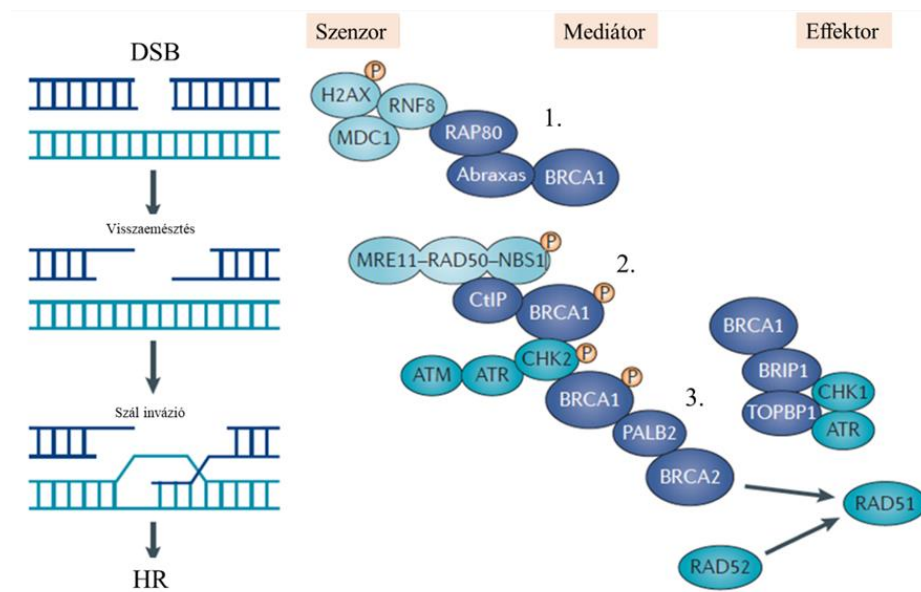
3. ábra: DNS károsító hatások és a javításukért felelős hibajavító útvonalak <sup>19</sup>. A sérült bázisok javításáért a báziskivágó hibajavítás (BER), a kiterjedtebb, egy szálát érintő sérüléseket a nukleotid kivágó hibajavítás (NER), míg a hibásan párosodott bázisokért a mismatch repair (MMR) útvonal felelős. A DNS kettősszalú törésének javításában két fő útvonal, a homológ rekombináció (HR) és a nem homológ végek összeillesztése (NHEJ) játszik szerepet.

A kettősszalú törések komolyabb veszélyt jelentenek a sejt megfelelő működésére, javításuk bonyolultabb folyamat. A DNS kettősszalú törése az egyik legveszélyesebb sérülés típus. Kettősszalú törést eredményezhet genotoxikus ágens, illetve ionizáló sugárzás, de a replikáció nem kívánt mellékterméke is lehet. A DNS másolása során a sejt számára nagyobb a DSB-k kialakulásának kockázata, mivel a csak az egyik szálát érintő sérülés is okozhatja a replikációs villa elakadását és összeomlását, ami kettősszalú törés kialakulását eredményezheti.

Emlős sejtekben a DSB-k két fő útvonalon keresztül kerülnek javításra. A hibamentes javítást biztosító HR az S/G2 fázisokban domináns, mivel működéséhez templát DNS-re van szükség, mely ezekben a sejtciklus fázisokban érhető el (testvér kromatida). A

kevésbé pontos, viszont gyorsabb és templátot nem igénylő NHEJ elsősorban a G1 fázisban aktív <sup>20</sup>. A hibamentes, homológ templát-függő HR hiánya kromoszóma átrendeződésekhez, ezen keresztül pedig genominstabilitáshoz vezet. A DDR DNS kettősszalú törésekre adott reakciójának részei azok az általános faktorok, amelyek a sérülést azonosítják, amelyek a hibát kijavítják és azok, amelyek közvetítőként vesznek részt az ehhez szükséges folyamatokban. Mindezek a homológ rekombinációs hibajavítás esetében: a szenzorok, amelyek detektálják a törött DNS végeket, az effektorok, amelyek kivitelezik a hibajavítási folyamatot és azok a mediátorok, amelyek közvetítenek a szenzorok és az effektorok között (4. ábra).

A BRCA fehérjék nélkülözhetetlen szerepet játszanak a DNS kettősszalú törésének hibamentes, homológ rekombináción alapuló javításában. BRCA-hiányos sejtekben a HR ennek megfelelően zavart szenved, helyét a NHEJ útvonal veszi át a kettősszalú DNS törések javításában. Ez az útvonal azonban további hibákat generál, ami kromoszóma átrendeződésekhez, genomi instabilitáshoz vezet <sup>21</sup>. A BRCA fehérjék különböző fehérjekomplexek részeként vesznek részt a homológ rekombinációs hibajavításban (4. ábra).



4. ábra: A BRCA1/2 szerepe a homológ rekombinációs hibajavításban a DNS kettősszalú törését követően. A szenzorok (világos kék) detektálják a sérülést, a mediátorok toborozzák, illetve aktiválják az effektorokat (közép kék), amelyek felelősek a hiba javításáért, valamint a sejtciklus ellenőrzőpontok aktiválásáért. A sötét késsel jelzett BRCA1-et is magában foglaló makrokomplexek nélkülözhetetlen mediátorai és segítői a DNS sérülésre adott válasznak. <sup>21</sup>.

A homológ rekombináció pre-szinaptikus fázisában az útvonal szenzorai felismerik a kettősszalú törést. (1) A BRCA1 az Abraxas-RAP80 (Abraxas receptor associated protein-80) kötésen keresztül lokalizál a sérüléshez <sup>22</sup>. A kettősszalú törés helyére toborzott endonukleáz komplex szál visszaemésztés útján 3' túlnyúló végeket hoz létre, melyet fehérjekomplex véd a degradációtól: (2) a BRCA1 kölcsönhatásba lép CtIP-vel (C-terminal binding protein interacting protein 1), amely iniciálja az 5' szál visszaemésztését, valamint az MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) komplexszel, amely elvégzi azt. A BRCA1 felelős az 53BP1 fehérje (p53 binding protein 1) ATM általi foszforilációjának megakadályozásáért, ilyen módon a DSB homológ rekombináció általi javításának elindításáért <sup>23</sup>. A BRCA1 a CtIP-vel együttműködve a kettősszalú törés helyén a szabad végeken az 5' vég visszaemésztését segíti elő <sup>24</sup>. A kialakuló 3' egyszalú DNS (ssDNS) végeket az RPA (Replication protein A) védi a degradációtól. A homológ rekombináció következő lépésében a (3) BRCA1- PALB2 (Partner and localizer of BRCA2)-BRCA2 komplex a Rad51-et a száltöréshez irányítja <sup>25</sup>, amely ott átveszi az RPA helyét, ezzel ssDNS-Rad51 nukleoprotein filamentumokat hozva létre. A Rad51 irányítja a templátként szolgáló intakt DNS szál invázióját és a D-hurok struktúra kialakítását <sup>26,27</sup>: a szinaptikus fázisban a Rad51 keresi meg azt a homológ DNS szakaszt, amely a javítás templátjaként fog szolgálni. Amint rátalál a homológ DNS szakaszra, a Rad51-ssDNS (Single stranded DNA) komplex megkezdí az intakt DNS duplexen a szálinváziót. A homológ DNS szálat áthelyezi és kialakítja a D-hurok struktúrát. Az áthelyezett, intakt szál szolgál a hibajavítás templátjául, ezzel két Holliday keresztet alakítva ki. A poszt-szinaptikus fázis keretein belül történik meg a Holliday kereszték feloldása, ezzel létrehozva két, kettősszalú DNS-t (dsDNA-Double stranded DNA) <sup>28</sup>.

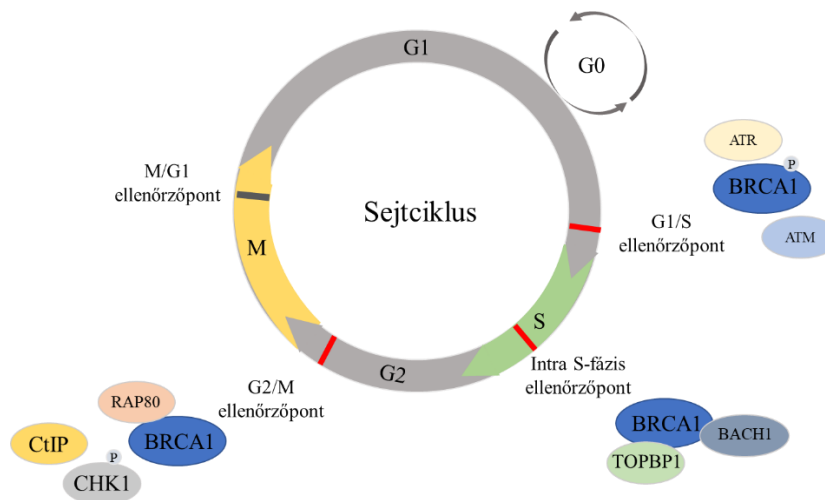
A BRCA1 a DNS kettősszalú törésének javításában a NHEJ útvonal szabályozásán keresztül is részt vesz. A javarészt hibahagyó útvonal a szabad DNS végeket homológ templát nélkül, direkt módon összeligálja. A NHEJ rövidebb idő alatt képes kijavítani a hibát <sup>29</sup> és a sejtciklus minden fázisában működik, ellentétben a homológ rekombinációval, amely az S és G2 fázisokra korlátozódik. A BRCA1 Ku80-nal történő interakciója stabilizálja a Ku70/Ku80 heterodimert, mely feladata a szabad DNS végek felismerése és számos NHEJ faktor toborzása a sérülés helyére <sup>30</sup>.

A BRCA fehérjék nem csak a DNS kettősszalú törésének javításában játszanak szerepet, hanem például a BRCA1 BACH1-gyel és TOPBP1-gyel alkotott komplexe révén a replikáció során fellépő hibák megszüntetésében is részt vesznek <sup>21</sup>. A BACH1 BRIP1 vagy FANCI néven is ismert. A FANCI név utal további szerepére is, a fehérje a

Fanconi anémia fehérjék egyike, amely szerepet játszik a DNS szálak közti keresztkötések kijavításában <sup>31</sup>. A BRCA1-BACH1 komplex határfelületként szolgál a DNS hibajavítás és a replikációs stressz között <sup>32</sup>, mindez a sejtciklus ellenőrző pontok funkciójánál fontos.

A BACH1, az Abraxas, valamint a CtIP is a BRCT doménjén keresztül lép kölcsönhatásba a BRCA1 fehérjével, így az ezt a régiót érintő mutációk negatív hatással vannak a BRCA1 DSB-hez toborzására, valamint szerepének betöltésére a homológ rekombinációs hibajavításban.

A DNS sérülésre adott válasz a sejtciklus ellenőrzőpontok megfelelő működését is magában foglalja. Az ellenőrzőpontok lehetővé teszik a sejtciklus megállítását a DNS másolása során (G1/S, intra-S fázis ellenőrzőpont), illetve a sejt osztódása előtt (G2/M ellenőrzőpont), annak érdekében, hogy a DNS-t érintő hibák ne öröklődjenek tovább a következő sejtgenerációra. A sejtciklus ellenőrzőpontok nem megfelelő működése a genetikai módosulások és a kromoszóma abnormalitások felhalmozódásához vezethet. A BRCA1 szerepet játszik a fent már említett komplexekkel történő interakción keresztül a sejtciklus ellenőrzőpontok szabályozásában is (5. ábra).



5.ábra: A BRCA1 és interakciós partnerei a sejtciklus ellenőrző pontok szabályozásában. A BRCA1/RAP80 komplex, a CtIP-vel segíti a CHK1 sérülés-indukált foszforilációját valamint a G2/M ellenőrzőpont aktiválását. Az S-fázis során a BRCA1-BACH-TOPBP1 komplex játszik szerepet a replikációs stresszre adott válaszreakcióban, míg a G1/S ellenőrzőpont megfelelő működéséhez foszforilált BRCA1-re van szükség, melyet az ATM vagy ATR kináz kivitelez és amely szükséges a p53 foszforilációhoz, ezen keresztül pedig az ellenőrzőpont aktivációjához.

A BRCA1-RAP80 komplex részt vesz a G2/M ellenőrzőpont aktiválásában. A RAP80 toborozza a BRCA1-et a DNS sérülés helyére, ahol a BRCA1 kromatin visszatartása elősegíti a CHK1 (Checkpoint kinase 1) foszforilációját a G2/M ellenőrzőpont aktivációja során<sup>33</sup>. Továbbá a CtIP is szükséges mind a CHK1 sérülés-indukált foszforilációjához, mind pedig a G2/M ellenőrzőpont aktivációjához<sup>34,35</sup>. A BRCA1 szerepet játszik a replikációs stresszre (például elakadt vagy összeomlott replikációs villa) adott válaszban is<sup>36</sup>. Mindez az S fázis során a BACH1-TOPBP1-BRCA1 interakción keresztül valósul meg<sup>37</sup>. A BRCA1-BARD1 komplex is részt vesz a sejtciklus G1/S, S és G2/M fázis ellenőrzőpontjainak szabályozásában. A G1/S ponthoz szükséges a BRCA1 foszforilációja, melyért az ATM vagy az ATR kináz felelős. Ez elősegíti a p53 fehérje foszforilációját, valamint a G1/S ellenőrzőpont aktivációját<sup>38</sup>. Emellett a BRCA1 kölcsönhat az MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) fehérjével, amely számos hibajavító fehérjét toboroz a DNS sérülés helyére, valamint az S és G2/M sejtciklus fázisok megakasztásához is szükséges<sup>39</sup>. Egyre több a bizonyíték arra, hogy a BRCA2 is szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában<sup>40</sup>.

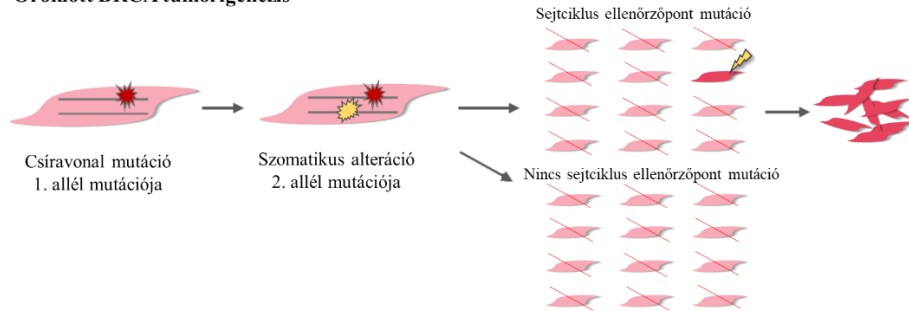
A BRCA1/2 fehérjék a transzkripció szabályozásában is részt vesznek<sup>41</sup>. Mára világossá vált, hogy ugyan a BRCA1 képes DBD doménjén keresztül közvetlenül kötni a DNS-t, mégsem szekvencia specifikus transzkripciós faktor, inkább számos transzkripciós faktor koregulátora<sup>42</sup>. A BRCA2 is szerepet játszik a transzkripció szabályozásában, többek között a p53-mal, egy ismert transzkripciós regulátorral való komplex formálásán keresztül<sup>43</sup>.

### 3.4. A BRCA1/2 vezette tumorevolúció

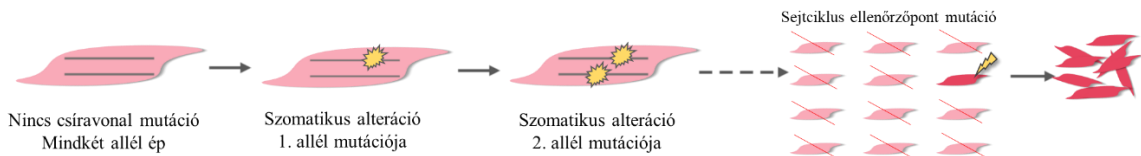
A BRCA1/2 gének nagy arányban tartalmaznak repetitív szekvenciákat (*Alu*, LINE, MER), amely ritka tulajdonság a gének körében<sup>44,45</sup>. Mindez hozzájárulhat a genetikai instabilitásukhoz<sup>46</sup>. Számos betegséghez kapcsolódó genetikai átrendeződés *Alu* szekvenciákhoz kötött. A BRCA génekben végbemenő genomi átrendeződések is az ismétlődő szekvenciák nagy arányával magyarázhatók<sup>47</sup>.

A BRCA gének által irányított tumorigenezis lehet öröklött vagy sporadikus típusú (6. ábra). Öröklött BRCA tumorigenezis esetén a patogén mutáció csíravonal eredetű, míg sporadikus típusnál az érintett BRCA gén mindkét allélja a szomatikus sejtekben sérül.

### Öröklött BRCA tumorigenezis



### Sporadikus BRCA tumorigenezis



6.ábra: A BRCA1/2 által irányított tumorigenezis. A BRCA gének mutációi szerepet játszanak mind az öröklődő daganathajlamban, mind pedig a sporadikus tumorigenezisben. Öröklött BRCA tumorigenezis esetén az érintett BRCA gén csírvonal eredetű mutációt hordoz heterozigóta formában, a másik allél a hordozó élete során, szomatikus sejtjében inaktiválódik. Sporadikus tumorigenezis esetén mindkét BRCA allél az egyén szomatikus sejtjeiben szenved sérülést. Mindkét típus esetében azonban szükséges a sejtciklus ellenőrzőpontok sérülése is ahhoz, hogy valamely BRCA génre homozigóta mutáns formában a sejt életben maradjon <sup>44</sup>.

Öröklött BRCA tumorigenezis esetén a második allél szomatikus sejtekben inaktiválódik, mivel a csírvonal eredetű homozigóta mutáns állapot embrionális letalitáshoz vezet az embriogenezis korai szakaszában <sup>48</sup>. A második BRCA allél szomatikus sejtekben történő elvesztésének módja nem teljesen tisztázott. A BRCA gének expressziós szintje magasabb terhesség és a pubertás ideje alatt. Mindezzel együtt ezen időszakokban az ösztrogén termelés is megnövekedett szintet mutat. Ez arra utal, hogy az ösztrogén befolyásolhatja a BRCA1/2 expressziós szintjét. A megnövekedett sejtosztódási frekvencia a sejtek számára replikációs stresszt okoz, amely esetben lehetséges, hogy nem elegendő az egy vad típusú kópia a sejtben betöltött szerepeinek ellátására (haplo-elégtelenség), mint normális esetben. Így nő a DNS sérülések mennyisége, valamint a nagy arányú ismétlődő szekvencia miatt fokozott a hibás homológ rekombinációs hibajavítás esélye, ami végső soron a vad típusú kópia elvesztéséhez (LOH- Loss of heterozygosity) vezethet <sup>44</sup> a Knudson-féle két találat hipotézisnek megfelelően <sup>49</sup>.

Mindkét BRCA allél elvesztése normális esetben a sejt halálához vezetne, viszont mégis jelen lehetnek olyan, ép BRCA alléllal nem rendelkező sejtek, melyek kikerülnek az apoptózist. Ez a BRCA hiányos állapot által kiváltott instabil genomi környezet

következménye lehet. Annak érdekében, hogy a sejt ilyen helyzetben is életben maradjon, szükséges a sejtciklus ellenőrzőponton való átjutás, így egy, a BRCA vezette tumorigenezishez szükséges további lépés a sejtciklus ellenőrzőpontok sérülése. Gyakran emögött a p53 fehérjét kódoló gén szomatikus mutációja azonosítható. Mindez a sejtek kontrollálatlan osztódásához vezet. Eközben további szomatikus mutációkat halmoznak fel az érintett sejtek <sup>44</sup>.

A BRCA gének mindkét alléljának szomatikus inaktivációja is vezethet daganat kialakulásához. Javarészt mindkét allél esetében az inaktivációért a fent már említett hibás homológ rekombináció és annak következményeként kialakuló nagyobb deléciók a felelősek <sup>50</sup>. Az első allél elvesztése általában a pubertáskori fokozott sejtosztódás és replikációs stressz idején következik be. A második allél 4 ok miatt inaktiválódhat: (1) szomatikus genom módosulás, (2) transzkripció csendesítés, (3) a haplo-elégtelenségnek tulajdonítható funkcióvesztés vagy (4) a poszttranszlációs módosítás hibája. Mivel mindkét allél a szomatikus sejtekben inaktiválódik, több mutációs eseménynek kell végbemenni az egyed élete során, így általában a szomatikus BRCA tumorigenezis eredményeként kialakuló daganat megjelenése idősebb korra tehető <sup>44</sup>.

### 3.5. A BRCA génekhez köthető daganatos megbetegedések

Napjainkban az emlőrák a leggyakrabban előforduló daganattípus, valamint a leggyakoribb rákos megbetegedéshez köthető halálok nők körében világszerte. Az öröklődő esetek, melyeknél a fiatal korban kialakuló daganatra hajlamosító génmutáció a csíravonalban jelen van és általában több családtag is érintett különböző generációkból, az összes eset körülbelül 5%-át teszik ki <sup>51</sup>. A BRCA1 heterozigóta csíravonal mutációi magas emlő- és petefészek daganat kialakulási kockázattal járnak már fiatal korban, ezt öröklődő emlő és petefészek daganat szindrómának (HBOCS- Hereditary Breast and Ovary Cancer Syndrome) nevezzük. Az öröklődő emlődaganatos esetek körülbelül 25-28 százalékaért BRCA1/2 mutáció felelős <sup>52</sup>. A BRCA1 mutációt hordozókban kialakuló daganatokra jellemző a megmaradt vad típusú BRCA1 allél elvesztése (LOH- Loss of heterozygosity), így a tumorsejtek BRCA1 null mutánsok lesznek. Általános vélekedés, miszerint a BRCA1/2 elvesztése következtében kialakuló DNS hibajavítás defektus okozta genom instabilitás a tumorfejlődés mozgatórugója <sup>53,54</sup>. Amellett, hogy a DNS hibajavítás károsodása vezet a tumor kialakulásához, ugyanez teszi a tumorsejteket szelektíven elpusztíthatóvá a homológ rekombináció deficienciáját szelektíven célzó



DNS károsító ágensek segítségével, mint például a platina alapú szerek, vagy a poli (ADP-ribóz) polimeráz inhibitorok (PARPi) <sup>55</sup>.

A BRCA1 és BRCA2 patogén variánsai nem kizárólag az öröklődő emlő- és/vagy petefészek, illetve nem csak nőket érintő daganatok kialakulásához járulnak hozzá. Sporadikus emlő-, valamint petefészek daganatokban is jelen vannak <sup>56</sup>, illetve a férfi emlődaganat, a hasnyálmirigy és a prosztatata tumorok kialakulásában is szerepet játszanak <sup>57,58</sup>, bár a prosztatata daganatok és a BRCA1 kapcsolatát illetően egy friss tanulmány szerint nincs megnövekedett kockázat <sup>59</sup>.

A BRCA1/2 gének mellett számos egyéb, ritkán előforduló hajlamosító gén mutációja is vezet emlő- és/vagy petefészek daganat kialakulásához eltérő penetranciával. Magas penetrancia szintű mutációk lehetnek jelen az *STK11* génben <sup>60</sup>, mely egy szerin-treonin kináz, a *PTEN* foszfatáz génjében <sup>61</sup>, vagy a *TP53*-ban <sup>62</sup>, mely a p53 fehérjét kódolja. A közepes penetranciájú csoportban számos, a BRCA funkcióhoz kapcsolódó gén található. Ilyenek például az *ATM* <sup>63</sup>, a *CHEK2* <sup>64</sup>, a *PALB2* <sup>65</sup>, a *Rad51* <sup>66</sup> vagy a *BARD1* <sup>67</sup>. A felsorolt gének és a számos további, alacsony penetranciájú variáns összességében az emlődaganatos esetek mindössze körülbelül 50%-áért felelős <sup>68</sup>, tehát még eddig azonosítatlan gének is szerepet játszanak a daganatos megbetegedésekre való hajlam kialakításában.

### 3.6. A BRCA gének mutációi

A BRCA1 vagy BRCA2 csírvonal mutációja 72%-kal, illetve 69%-kal növeli az esélyt emlődaganat kialakulására 80 éves kor előtt <sup>69</sup>. Mivel mindkét gén tumorszupresszor, funkcionálisan recesszívek, így mindkét allél mutációja szükséges a daganat kialakulásához.

Napjainkban számos adatbázis érhető el, mely tartalmazza az ismert BRCA1 és BRCA2 gént érintő mutációkat. A BRCA Exchange, mely több klinikai adatbázisban (például ClinVar, BIC) fellelhető összes információt gyűjti egybe a BRCA1/2 génekkel kapcsolatban. Jelenleg több, mint 20.000 BRCA variánst tartalmaz, amelyek közül több, mint 3700 variáns bizonyítottan patogén.

Mindkét gén polimorf, az azonosított mutációk nagyrésze az expresszió elvesztésével, vagy a fehérje csonkolódásával jár. Mindkét gén esetében számos misszensz mutáció, illetve in-frame inszerció/delécio ismert. Ezek jelentik a legnagyobb problémát a kockázat értékelés szempontjából, mivel ezen mutációk fehérje funkcióra gyakorolt

hatása nem mindig ismert <sup>70</sup>. A megfelelő kockázat értékelés, a tanácsadás és az esetleges megelőző kezelések/beavatkozások (tehát a klinikai menedzsment) érdekében szükséges az ismeretlen jelentőségű variánsok fehérje működésre gyakorolt hatásának további vizsgálata, mivel a kockázatértékeléshez elegendő mennyiségű statisztikai adat nem áll rendelkezésre. Azokat a mutációkat, melyek klinikai jelentősége bizonytalan, VUS (Variant of Uncertain Significance) mutációnak nevezzük <sup>71</sup>. Mindkét gén esetében jelenleg is több száz VUS variáns ismert.

A VUS variánsok vizsgálatára több lehetőség is adott. Egyrészt lehetőségünk van különböző bioinformatikai szoftverek segítségével prediktálni a mutáció fehérjére és ezzel együtt a hordozóra gyakorolt hatását. Másrészt funkcionális kísérletek keretein belül is vizsgálhatjuk a laboratóriumi körülmények között előállított variánsok hatását. Mivel mind a BRCA1, mind a BRCA2 multidomén fehérje, számos, a sejt számára kulcsfontosságú folyamat résztvevője, így nincs egy konkrét kísérlet, aminek keretein belül eldönthető bármely variánsról, hogy az patogén-e vagy sem. A fehérjék egyes doménjeire, azok funkcióira specifikus kísérletekkel vizsgálhatjuk az adott régiót érintő VUS variánsokat.

A BRCA1-et és a BRCA2-t érintő patogén mutációk a génben elszórtan, bárhol előfordulhatnak, viszont viszonylag gyakran előforduló, populációnként változó, úgynevezett alapító (founder) mutációk figyelhetők meg. A magyar populációban 5 gyakoribb elváltozás ismert, a BRCA1 esetében ezek a c.66\_67delAG, a c.181T>G és c.5263-5264insC, míg a BRCA2 esetében a c.5946\_5946delT és a c.9098\_9099insA. A magyar HBOCS betegek esetében a BRCA1/2 génekben azonosított mutációk 50-60%-át ez az öt variáns teszi ki <sup>72,73</sup>.

### 3.7. A BRCA1/2 diagnosztika

A BRCA diagnosztika nagyrészt direkt szekvenálásra épül <sup>74</sup>. Négy kimenetel lehetséges a szekvenálás eredménye szempontjából: (1) nincs szekvencia eltérés, ennek az eredménynek abban az esetben van nagy jelentősége, ha egy másik családtagnál már azonosításra került egy BRCA gént érintő patogén variáns. (2) Patogén variáns: a vizsgált egyén számára az emlő- és/vagy petefészek daganat kialakulás kockázata fokozott. (3) Polimorfizmus vagy neutrális variáns: nincs megnövekedett kockázat, akár az (1) csoport esetében. (4) Ismeretlen klinikai szignifikanciájú variáns (VUS): a variáns klinikai jelentősége, az ezzel járó kockázat mértéke ismeretlen.

A VUS variánsok osztályozására 2008-ban az IARC (International Agency for Research on Cancer) bevezetett egy öt osztályt tartalmazó, a patogenitás valószínűségének mértékén alapuló, multifaktoriális modellekből származtatott rendszert: 1. osztály: nem patogén/ nincs klinikai szignifikancia, 2. osztály: valószínűleg nem patogén/ alacsony klinikai szignifikancia, 3. osztály: bizonytalan, 4. osztály: valószínűleg patogén, 5. osztály: biztosan patogén. Az egyes osztályokban a patogenitás valószínűsége rendre  $<0,001$ ,  $0,001-0,049$ ,  $0,05-0,949$ ,  $0,95-0,99$  és  $>0,99$  <sup>75</sup>.

A BRCA gének molekuláris diagnosztikai tesztelése általában direkt módon, Sanger szekvenálással történik. A módszer technológiai szempontból megbízható, széles körben elérhető és a kivitelezése is viszonylag egyszerű. Mindemellett viszont az áteresztőképessége limitált, és a költséghatékonysága is rosszabb, mint az újgenerációs szekvenálásé (NGS- Next Generation Sequencing). Továbbá a Sanger szekvenálás önmagában nem alkalmas a nagy genomi átrendeződések kimutatására. Az NGS számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik a Sanger szekvenáláshoz képest. Alkalmas a nagy genomi átrendeződések vizsgálatára, nagyáteresztőképességű, egyszerű a munkafolyamata, egyéb genetikai tesztekkel párhuzamosan is futtatható, valamint az egységnyi költsége is alacsonyabb <sup>76</sup>.

### 3.8. A BRCA1 BRCT domént érintő VUS mutációinak funkcionális vizsgálati lehetőségei

Számos funkcionális kísérlet ad lehetőséget a BRCA1 VUS variánsok vizsgálatára különböző organizmusokban. Ezek közül néhány, a BRCT doméneket érintő mutációk viselkedésének megismerésére alkalmas módszer kerül itt bemutatásra (1. táblázat):

A BRCA1 szerepet játszik a transzkripció szabályozásában <sup>77</sup>. A TA teszt <sup>78</sup> alapját a BRCA1 C-terminálisának riporter gén transzaktivációs képessége adja, amennyiben az egy heterológ DNS-kötő doménhez (DBD) van fuzionáltatva <sup>79,80</sup>. A kísérlet a fehérje BRCT doméneket is magába foglaló C-terminális régiójának (as 1396-1863) funkcióképességét vizsgálja <sup>81</sup>. Élesztő alapú kísérlet továbbá az élesztő kis kolónia fenotípus módszer (SCPA-Small Colony Phenotype Assay). A módszer alapját az a tény adja, miszerint a vad típusú BRCA1 fehérje expressziója élesztő sejtekben akadályozza azok növekedését <sup>82-84</sup>. Ez a módszer kvalitatív és kvantitatív mérési lehetőséget is biztosít, mivel az élesztő kolóniák mérete és a kolónián belüli sejtszám is vizsgálható. Nincs inhibíció a trunkált/C-terminálist érintő patogén variánsok esetében <sup>84,85</sup>. A kísérlet

a BRCT domén variánsok (as 1646-1853) vizsgálatára korlátozódik, az ebből származó eredmények jól korrelálnak a TA teszt eredményeivel <sup>82</sup>.

Számos kísérleti módszert alkalmaznak VUS variánsok vizsgálatára humán sejttényezetekben. A BRCA1 fehérje humán sejtekben nagyrészt a sejtmagban található <sup>85-88</sup>, de kis mennyiségben a citoplazmában is detektálható <sup>89-92</sup>. A fehérje mind NLS (as 503-508, 606-615), mind pedig NES (as 22-30, 81-99) szignált hordoz, ezzel biztosítva a sejten belüli lokalizáció kontrollját és a sejtmagi vagy citoplazmába irányuló transzportját <sup>91</sup>. Az egyes variánsok klinikai szignifikanciáját vizsgálhatjuk azok sejten belüli lokalizációja alapján, hiszen, ha egy variáns nem képes bejutni a sejtmagba, úgy a feladatait sem tudja megfelelően ellátni. A BRCA1 sejtmagi lokalizációjához nem csupán a BARD1 kötése szükséges, valamilyen eddig nem azonosított faktor is szerepet játszik a fehérje sejtmagba történő belépésében, amely a BRCT doménekhez köthető <sup>93</sup>. A BRCA1 lokalizációs kísérletekben általában sejtmagi, diffúz (sejtmagi-citoplazmatikus) és citoplazmatikus lokalizációs osztályokat különböztetnek meg <sup>93,94</sup>.

A BRCA1 fehérje esszenciális szereppel bír a DNS kettőszálú törésének homológ rekombináció útján történő javításában <sup>94</sup>. Ransburgh és munkatársai létrehoztak egy vizsgálati rendszert, a DR-GFP rendszert, mellyel a homológ rekombináció hatásossága vizsgálható egy mesterségesen, *I-SceI* endonukleáz által generált kettőszálú DNS törés javításán keresztül <sup>95</sup>. Ahhoz, hogy a BRCA1 megfelelően el tudja látni feladatát a homológ rekombinációban, intakt RING és BRCT domének kellene <sup>93</sup>, ennek megfelelően mind a RING, mind pedig a BRCT doméneket érintő mutációk vizsgálhatók ezzel a módszerrel.

Mivel a BRCA1 nélkülözhetetlen szerepet játszik a DNS kettőszálú törésének homológ rekombináción keresztül történő javításában, a BRCT domén mutáns BRCA1 variánsok működésének vizsgálatához különböző DNS károsító ágensekkel szembeni érzékenységi tesztet is végezhetünk. Általában ehhez ionizáló sugárzást (IR) <sup>96</sup>, vagy valamilyen, a DNS kettőszálú törését közvetetten előidéző vegyülettel történő kezelést alkalmaznak, például mitomicin-C-t vagy ciszplatint. Emellett a BRCA gének esetében lehetőség van PARP inhibitorok alkalmazására is. A PARP1 inhibíciója és a BRCA1 diszfunkciója szintetikus letalitást mutat. A PARP1 az egyesszálú DNS törések javításában központi szerepet játszik, ezért gátlása esetén az egyesszálú törés kettőszálúvá teljedhet ki. Amennyiben nem áll rendelkezésre a sejten működőképes BRCA1 fehérje, úgy a hibamentes DSB javítás sem lehetséges, így a DNS sérülések felszaporodnak, amik genom instabilitáshoz és a sejt halálához vezethetnek <sup>97</sup>. Ezek

fényében az ismeretlen klinikai szignifikanciájú BRCA1 variánsok vizsgálatára alkalmas módszer a variánsok túlélésének monitorozása különböző DNS károsító ágensek, illetve specifikus inhibitorok jelenlétében.

Az eddigiektől eltérően a CRISPR/Cas9 technikán alapuló szaturációs genom editálás módszere nem emeli ki a gént a genomi környezetéből. A Cas9 enzim a vizsgálni kívánt mutáció genomi régiójára specifikus guide RNS segítségével a sejt által kódolt BRCA1 génben generálja a módosítást. A HAP1 humán, haploid sejt vonal genomjában létrehozott módosítás hatása túlélési teszttel vizsgálható. Ez a módszer lehetőséget ad exon/intron határon található, valamint a nem transzlálódó régiókat érintő mutációk vizsgálatára, viszont költséges és klónozási lépéseket ugyanúgy igényel, mint a fent említett módszerek

98.

A funkcionális kísérlet neve	A kísérlethez használt organizmus	A vizsgálható BRCA1 régió	A módszer működési elve
Transzkripció aktiváció teszt (TA)	<i>S. cerevisiae</i>	C-terminális (as 1396-1863)	A BRCA1 C-terminális riporter gént transzaktivációs képességgel rendelkezik, amelynek a régió intaktsága a függvénye
Kis kolónia fenotípus kísérlet (SCPA)	<i>S. cerevisiae</i>	C-terminális (as 1646-1853)	A humán BRCA1 expressziója élesztő sejtekben azok növekedését akadályozza. Ehhez intakt BRCT domének szükségesek. Amennyiben a BRCT domének funkciót befolyásoló mutációt hordoznak, úgy a kis kolónia fenotípus nem detektálható
Lokalizáció	humán sejt kultúra	N-terminális BARD1 kötő régió (as 1-109), BRCT domének (as 1646-1863)	A BRCA1 alapvetően sejtmagi lokalizációjú, amennyiben a sejten belüli helyzete nem megfelelő, úgy a feladatait sem tudja ellátni hiánytalanul

A funkcionális kísérlet neve	A kísérlethez használt organizmus	A vizsgálható BRCA1 régió	A módszer működési elve
DR-GFP módszer	humán sejt kultúra (stabil sejt vonal)	RING és BRCT domének	A HR funkció vizsgálata stabil sejt vonal segítségével, a homológ rekombinációs események követhetők nyomon. A RING, illetve BRCT domén mutáns variánsok csökkent HR kapacitást mutatnak
Szenzitívás teszt	humán sejt kultúra	RING és BRCT domének	DNS károsító ágensek hatásának vizsgálata, ionizáló sugárzás, ciszplatin, vagy mitomicin-C segítségével, mindezek kiegészíthetők Olaparib szenzitivitás vizsgálattal a HR deficiencia és PARPi szintetikus letalításra alapozva
Szaturációs genom editálás	haploid humán sejt vonal	Teljes BRCA1 genomai régió	A kvázi haploid humán HAP1 sejt vonal genomai DNS-ében kódolt BRCA1-t módosítja CRISPR/Cas9 módszerrel, az egyes variánsok expressziója esetén a sejtek túlélését vizsgálja

1.táblázat: A BRCA1 BRCT domént érintő VUS variánsainak vizsgálatára alkalmas funkcionális kísérletek.

## 4. Célkitűzések

A BRCA1 és BRCA2 szerepe jelentős az emlő és petefészek daganatok öröklött (HBOCS), valamint sporadikus formái esetében egyaránt. Mind prevenció, mind pedig a már kialakult daganat kezelésének szempontjából fontos tudni, hogy az azonosított, BRCA gént érintő mutáció klinikai szempontból releváns-e vagy sem. A molekuláris diagnosztika eszköztára egyaránt lehetővé teszi a prevenció célból történő esetleges hordozott mutáció azonosítását, és a már kialakult daganat esetén, annak molekuláris hátterének feltérképezését. A személyre szabott tumorterápiához nem feltétlenül elegendő a tumorból vett nagyobb szövetminta vizsgálata, mivel a tumort genetikai heterogenitás jellemzi, a tumorsejt alpopulációk genetikai háttere eltérő. Nagy sejttömegek együttes szekvenálása a ritka variánsokat elfedheti, ezzel értékes információt veszítve. Az azonosított, viszont klinikai szempontból ismeretlen jelentőségű BRCA mutációk esetében a hordozóval kapcsolatos további lépések- az esetleges szükségszerű prevenció lépések- bizonytalanok, így ezek funkcionális vizsgálata szükséges annak érdekében, hogy mind a hordozó, mind a kezelő orvos megfelelő információt kaphasson a mutáció jelenlétének esetleges következményeiről.

**Kutatásunk fő célja, hogy mélyebb betekintést nyerjünk négy, a BRCA géneket érintő, ismert, illetve ismeretlen klinikai szignifikanciájú mutációkkal kapcsolatban.** Mindezt az alábbi részfeladatok elvégzésével kívántuk megvalósítani:

1. BRCA1/2 mutációk azonosítása betegek tumoros mintáiból újgenerációs szekvenálás segítségével.
2. Az azonosított BRCA2-t érintő patogén variáns vizsgálata a beteg tumoros és egészséges, nagy sejtszámot magába foglaló szövetmintában, Sanger és újgenerációs szekvenálással.
3. Az azonosított BRCA2 variáns allélarányának vizsgálata különböző szövettípusok esetén egészen az egyedi sejtek szintjéig, Sanger és újgenerációs szekvenálással
4. A nagy sejtszámot tartalmazó és az 5-10 sejtes klaszterek, illetve egyedi sejtek szekvenálási eredményének összevetése

5. Az ismeretlen klinikai szignifikanciájú BRCA1 variánsok vizsgálata bioinformatikai predikciós szoftverek segítségével
6. A BRCA1 VUS mutációk létrehozása molekuláris klónozással
7. A létrehozott BRCA1 VUS variánsok vizsgálata egy általunk választott élesztő alapú funkcionális kísérletben
8. A funkcionális kísérlet eredményének összevetése a bioinformatikai predikcióval és következtetések levonása a vizsgált BRCA1 VUS mutációk patogenitásával, kezelési lehetőségével kapcsolatban



## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1. Tápoldatok

- LB tápfolyadék: Tripton (10 g/l), nátrium-klorid (NaCl) (10 g/l), élesztőkivonat (5 g/l), pH 7.5
- LB táptalaj: LB tápoldat, Bacto agar (1,5%)
- YPD tápoldat: 1% élesztőkivonat, 2% pepton, 2% dextróz
- YPD táptalaj: YPD tápoldat, 2% bacto-agar
- Omission media (OMM): Omission media (OMM): 0,72% omission media mix (600 ml térfogathoz: 0,96 gramm élesztő nitrogén alap, 3 gramm (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 18 mg adenin, 12 mg arginin, 12 mg hisztidin, 18 mg izoleucin, 18 mg leucin, 18 mg lizin, 12 mg metionin, 30 mg fenilalanin, 12 mg triptofán, 18 mg tirozin, 12 mg uracil, 90 mg valin), 2% D-glükóz. Táptalajhoz: 1,67% bacto-agar
- -Leu tápoldat: 0,72 g OMM mix (-Leu), 2 g dextróz (100 ml-re)
- -Leu táptalaj: -Leu tápoldat, 2% bacto-agar
- +12 tápoldat: minden aminosavat tartalmaz

### 5.2. Antibiotikumok és szelekciós reagensek

- Ampicillin: 100 µg/ml
- Kanamicin: 50 µg/ml
- Kloramfenikol: 30 µg/ml

### 5.3. Ellenanyag

A kísérletek során használt ellenanyagot a 2. táblázat tartalmazza:

Antigén	Származási organizmus	Jelölés	Gyártó	Katalógusszám	Hígítás mértéke
HA	patkány	HRP	Roche	12013819001	5000x

2. táblázat: A kísérletek során alkalmazott ellenanyag

#### 5.4. Alap oldatok

- Blokkoló oldat (Western blot): 1xTBS-Tween, 5% BSA
- SDS puffer: 10xpuffer: 30,2 g Tris, 144 g glicin, 10 g SDS/1l
- Transzfer puffer: 10xpuffer: 24 g Tris, 111,6 g glicin/1l, a blottoláshoz 10x hígított oldat
- TBS puffer: 10xpuffer: 1500 mM NaCl, 200 mM Tris HCl (pH 7,5)
- TBS TWEEN oldat: 10xpuffer: 10xTBS puffer, 0,05% TWEEN20
- Katapult puffer: 10 mM EDTA, 2 mM Tris pH8, 0,5% Igepal (Sigma, kat. szám: 18896)

#### 5.5. Oligók és egyéb oligonukleotidok

- BRCA2 c.7795G>T genomi amplifikáció oligók  
GGATAGTCAAGGTCAGGTGGGCTCATACCCTCCAATGATGGAAAG  
GACGCTGGAATGTAACAATGGGAGAAGAAAGAGGGATGAGGGAATAC
- BRCA1 c.5410G>A mutagén PCR oligók  
CCTTGGCACAGGTATCCACCCAATTGTGGTTGTGCAGCCAGATGC  
GGTGGATACCTGTGCCAAGGGTGAATGATGAAAGCTCCTTCACCAC
- BRCA1 c.5096G>T mutagén PCR oligók  
GTGTGTGAACTGACACTGAAATATTTTCTAGGAATTGCGGGAG  
TTCAGTGTCAGTTCACACACAACTCAGCATCTGTTTTTCATAAC
- BRCA1 c.4983delA mutagén PCR oligók  
CCAGAAGATTTATGCTCGTGTACAAGTTTGCCAGAAAACACCAC  
CACGAGCATAAATCTTCTGGGGTCAGGCCAGACACCACCA
- BRCA1 c.1067A>G mutagén PCR oligók  
GGAATAAGCGGAAACTGCCATGCTCAGAGAATCCTAGAGATACTGAAGATG  
GGCAGTTTCCGCTTATTCCATTCTTTTCTCTCACACAGGGGATCAG

- BRCA1 c.5123C>A mutagén PCR oligók  
CTAGGAATTGAGGGAGGAAAATGGGTAGTTAGCTATTTCTGGG  
TTCCTCCCTCAATTCCCTAGAAAATATTTTCAGTGTCCGTTTACA
- BRCA1 c.5559C>A mutagén PCR oligók  
CTGGACACCTAACTGATACCCCAGATCCCCCACAGCC  
GGTATCAGTTAGGTGTCCAGCTCCTGGCACTGGTAGAGTGC

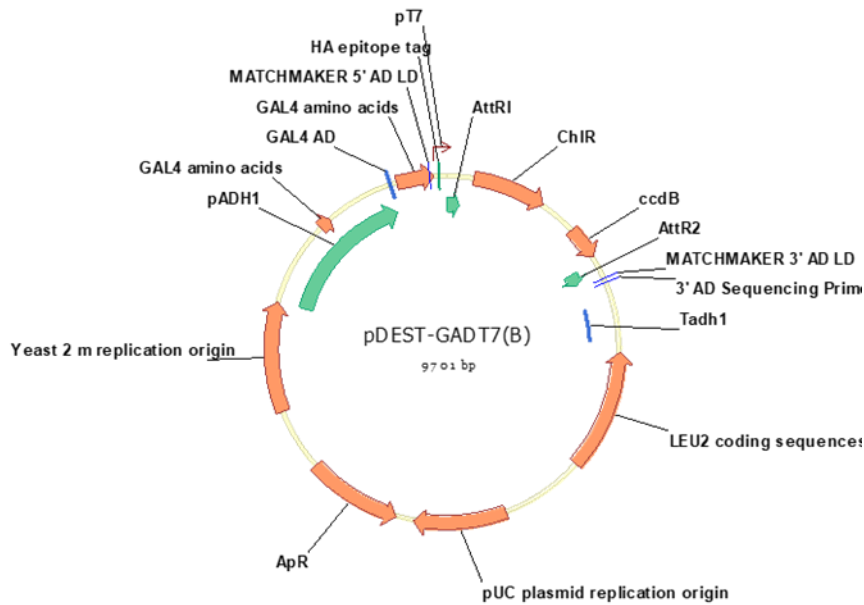
## 5.6. Plazmidok

A kísérletek során használt plazmidokat a 3. táblázat tartalmazza:

Gén	Vektor	Leírás
	pBlueScript II KS+	A mutagén PCR reakciókhoz használt vektor, melybe a BRCA1 fragmenteket építettük
BRCA1	pENTR1A	A BRCA1 cDNS-t hordozó entry vektor LR reakciókhoz
LacZ	pCR8-GW-TOPO	A negatív kontrollként használt LacZ kódoló régiót hordozó entry vektor LR reakcióhoz
GW	pDEST-GADT7(B)	Élesztő expressziós Gateway klónozásra alkalmas vektor, N-terminális HA tagelt

3. táblázat: A kísérletek során felhasznált plazmidok

A BRCA1 VUS mutációk funkcionális vizsgálatához használt expressziós vektor térképe az 7. ábrán látható:



7. ábra: A BRCA1 VUS variánsok funkcionális vizsgálatához használt élesztő expressziós vektor. A vektor gateway klónozásra alkalmas, valamint hordoz egy N-terminális HA taget.

## 5.7. Baktériumtörzsek

- 2T1 Omnimax
- ccdB survival

## 5.8. Élesztőtörzs

- Hf7c

## 5.9. A kísérletek során alkalmazott módszerek

### 5.9.1. Restriktív endonukleázzal történő emésztés

A DNS restriktív endonukleázzal történő emésztésekor a DNS 1 µg-jához 1 egység (unit) enzimet használtunk (ThermoFisher Scientific). A 10x tömény pufferek közül (Red, Blue, Yellow, Green, Orange) választottuk ki az enzim számára megfelelőt a gyártó javaslatai alapján. Az emésztést 2 óráig végeztük 37°C-on. Ezt követően a reakcióhoz 5x STOP puffert adva a várt DNS fragmentumok méretétől függően 0,8-1,5%-os töménységű agaróz gélen futtattuk meg. Szükség esetén a gélből a megfelelő méretű fragmentet kivágtuk.

### 5.9.2. Fragment izolálása agaróz gélből

Az agaróz gélből való DNS izolálásokhoz a Macherey Nagel Nucleospin Gel and PCR clean up kitet (kat. szám: 740609.250) használtunk a gyártó ajánlásának megfelelően.

### 5.9.3. A BRCA1 variánsok előállítás: mutagén PCR, a klónozás további lépései

A mutagén PCR reakciókhoz a következő összetevőket használtuk 50 µl-es végtérfogathoz: 10 µl 5x HF puffer, 0,4 µl 25 mM dNTP (végkoncentráció: 200 µM), 2,5-2,5 µl forward és reverse 10 µM primert (0,5 µM végkoncentráció), 10 ng templát DNS 1 µl-ben, 0,5 µl Phusion polimeráz (ThermoFisher Scientific, kat.szám: F530S) (végkoncentráció: 0,02 U/µl), mindezt kiegészítettük 50 µl-re Accugene (Lonza, kat.szám: BE51200) vízzel.

A mutagén PCR-ek során használt oligók és a PCR programok tervezése során Liu és Naismith cikkét vettük alapul <sup>99</sup>. Az alábbi táblázatban (4. táblázat) látható összefoglalva az összes mutáció létrehozásához használt PCR program:

Variáns	Denat.	Ciklikus denat.	Annealing	Elongáció	Denat.	Annealing	Elongáció	Tartó hőmérséklet	Várt termék hossz (bp)
	5 min	1 min	1 min	5 min	3 min	1 min	15 min	∞	
	1x		12x		1x	1x	1x		
c. 5410G>A	98°C	98°C	55°C	72°C	98°C	50°C	72°C	20°C	4602
c.5096G>T	98°C	98°C	45°C	72°C	98°C	38°C	72°C	20°C	4602
c.4983delA	98°C	98°C	50°C	72°C	98°C	45°C	72°C	20°C	4601
c.1067A>G	98°C	98°C	54°C	72°C	98°C	46°C	72°C	20°C	4316
c.5123C>A	98°C	98°C	47°C	72°C	98°C	41°C	72°C	20°C	4602
c.5559C>A	98°C	98°C	48°C	72°C	98°C	39°C	72°C	20°C	4602

4. táblázat: A mutagén PCR-ekhez használt programok összefoglalása. \* Denat.: denaturációs hőmérséklet.

A PCR reakció végeztével 1 µl *DpnI* restrikciós endonukleázt adtunk a reakcióhoz, majd 2 órán át 37°C-on inkubáltuk, végezetül a DNS-t kicsaptuk 0,5x térfogat ammónium-acetát (NH<sub>4</sub>Ac) és 2,5x össztérfogat etanol (EtOH) (DNS+ NH<sub>4</sub>Ac) segítségével (10 perc szobahőn történő inkubáció, majd 30 perc centrifugálás 13.400 rpm-en).

#### **5.9.4. Ligálás**

A ligáláshoz T4 DNS ligáz enzimet és a hozzá tartozó 10x T4 ligáz puffert (ThermoFisher Scientific) használtuk. A reakciót egy éjszakán át 16°C-on inkubáltuk. A DNS-fragmenteket 1:1 arányban alkalmaztuk, szükség esetén a reakciót laboratóriumi tisztaságú vízzel (Milli Q) egészítettük ki 10 µl-re.

#### **5.9.5. LR reakció**

Az LR reakcióhoz a következő mixet mértük össze: 75 ng „entry” vektor (1 µl-ben), 100 ng „destination” vektor (1 µl-ben), 0,5 µl LR II klonáz. Az elegyet egy éjszakán át szobahőn inkubáltuk. Ezt követően a klonáz inaktiválásához a reakciót kiegészítettük 0,5 µl (2 µg/µl) Proteináz K oldattal és 10 percig 37°C-on inkubáltuk. Végül az elegyet elektrokompetens bakteriumsejtekbe transzformáltuk.

#### **5.9.6. Baktériumsejtek kémiai transzformációja és elektroporációja**

A kémiai transzformációhoz a kompetens bakteriumsejtek tartalmazó mikrocentrifuga csövet jégre tettük, hagytuk kiolvadni. Kiolvasztás után a transzformálni kívánt DNS-t hozzáadtuk a bakteriumsejtekhez, majd 30 percet jégen hagytuk a bakterium-DNS elegyet. Ezt követően a hősokkhoz 42°C-os vízfürdőbe tettük a mixet 45 másodpercre, majd 1 ml-re LB tápoldattal kiegészítve 37°C-on inkubáltuk 1 órát, végül a megfelelő szelekciós táptalajra szélesztettük. A sejteket egy éjszakán át 37°C-on növesztettük.

Az elektroporációhoz az elektrokompetens sejtet szintén jégen hagytuk kiolvadni, majd hozzáértük a DNS-t és az elegyet 10 percig jégen hagytuk. Az előre behűtött küvettába (2mm) mértük az elegyet, majd 2,50 kV-tal elektroporáltuk. Ezt követően a sejteket reszuszpendáltuk 1 ml LB tápoldatban és 1 órát növesztettük 37°C-on, majd a megfelelő szelekciós táptalajra szélesztettük. Egy éjszakát inkubáltuk a lemezeket 37°C-on.

#### **5.9.7. Élesztősejtek transzformációja**

A kompetens Hf7c élesztősejteket jégen kiolvasztottuk, majd hozzáadtunk 1 µg plazmid DNS-t. Ezt követően 300 µl PEG-LiAc-t (polietilén-glikol-lítium-acetát) adtunk a mixhez. 30°C-on 30 percet inkubáltuk a mintát rázatás mellett. 38,5 µl DMSO-t adtunk a mintához. Ezt követően a mintát 15 percig 42°C-on hősokkoltuk. A hősokkolt elegyet centrifugáltuk 3000 rpm-en 2 percig. A felülúszó eltávolítása után a pelletet 1 ml +12 tápoldatban reszuszpendáltuk, majd egy éjszakán át 30°C-on rázatás mellett inkubáltuk.

Másnap a mintát centrifugáltuk 3000 rpm-en 2 percig. A felülúszót nagyrészt eltávolítottuk, a mintán hagyott körülbelül 100 µl médiumban a pelletet visszaoldottuk, majd -Leu táptalajra szélesztettük. Körülbelül 48 óra alatt 30°C-on felnövesztettük a transzformáns élesztő telepeket.

#### **5.9.8. A BRCA1 variánsok klónozása expressziós vektorba**

Mind az élesztő, mind az emlős expressziós gateway vektorokba LR reakció segítségével építettük be a különböző BRCA1 variánsokat.

#### **5.9.9. Plazmid tisztítás baktériumsejtekből**

A plazmidokat módosított alkalikus lízis módszerrel izoláltuk a baktériumsejtekből<sup>100</sup>.

#### **5.9.10. A mutációk azonosítása betegekből származó tumorszövet mintákból**

A mutációkat a Celemics OncoRisk panel segítségével azonosítottuk újgenerációs szekvenálással (Illumina Miniseq).

#### **5.9.11. Genomi DNS izolációja a BRCA2 mutációt hordozó beteg szövetmintáiból**

A szövetblokkokból és a vérmintából történő gDNS izolációhoz a fenol-kloroform módszert alkalmaztunk<sup>101</sup>. A lézer mikrodisszekcióval izolált egyedi sejtek és sejtklaszterek esetében a sejteket 5 µl katapult pufferbe gyűjtöttük be. Ezt követően 0,5 µl 1 mg/ml koncentrációjú Proteináz K-t (Qiagen, kat.szám: 19131) adtunk a mintákhoz. 60°C-on 20 percig inkubáltuk, amelyet 3 perc 98°C-os inkubáció követett.

#### **5.9.12. Western blot**

Az élesztősejtekből történő Western blot kísérletekhez a 100 ml-be leoltott, egy éjszakán át 30°C-on növesztett mintákon OD-t mértünk, ez alapján minden mintából azonos mennyiségű élesztősejtet mértünk ki, ezt -Leu tápoldattal azonos térfogatra egészítettük ki. Ezt követően 4000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk a mintákat. A pelletet 1 ml MQ-ban reszuszpendáltuk, majd ismét centrifugáltuk. A pelletet 1 ml 0,1 M NaOH oldatban reszuszpendáltuk, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, végül ismét centrifugáltuk. A NaOH eltávolítása után a mintákat 50 µl 2xSDS pufferben reszuszpendáltuk. A sejtízátumokat 8%-os poliakrilamid gélen futtattuk meg. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, 150 mA-rel, 12 óra inkubációval, 4 °C-on. A membránt ezt követően 6 órát blokkoló oldatban inkubáltuk. Az

elsődleges ellenanyagot blokkoló oldatban hígítottuk, a membránt az elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán át inkubáltuk. Az ellenanyaggal történő inkubációt követően a membránt 2x15 percig mostuk 1xTBS-Tween-nel, majd 1x10 percig 1xTBS-sel. Az előhíváshoz WesternBright ECL (Advansta, kat. szám: K-12045-D20) kemilumineszcencián alapuló kites és Alliance Q9 (Uvitec) berendezést használtunk.

#### **5.9.13. Az élesztő kolóniák mérése**

Az élesztő kolóniákat a transzformációt követően felnövesztettük, majd a telepeket (minta típusonként 50-100 darab) a Chemi HR 410 Imaging System berendezés UVP Vision Works LS „Colony counting” programcsomagjával mértük meg (101309-008).

#### **5.9.14. A BRCA2 c.7795G>T mutációt hordozó beteg kórtörténete**

66 éves nő, egyéb jelentőségteljes betegsége nem volt. Testvére nincs, édesapjánál korábban rákot diagnosztizáltak (nem specifikált). A beteg szüleinél nem azonosítottak daganatos elváltozást. A szülőktől DNS mintagyűjtésre nem volt lehetőség. 2011.-ben diagnosztizálták a beteget szerózus ovárium karcinómával (WHO grade 2.). Ugyanebben az évben a beteg hysterectomián és kétoldali adnexectomián esett át. A protokoll alapján TAX-BCP kezelést kapott a beavatkozások után, de a mellékhatások miatt a dózis csökkentése volt szükséges. Ezen felül Olaparib (Lynparza) kezelést kapott. A beteg állapota 2017. óta stabil. A beteg tumorszövet mintáját Celeomics OncoRisk tumor panel (Celeomics, P002) segítségével szekvenálták. A 31 további gén, melyre a szekvenáló panel specifikus, nem mutatott ki további mutációkat, melyek hatással lennének a tumorigenezisre. A beteg írásos formában beleegyezett mintáinak további vizsgálatába diagnosztikai céllal.

#### **5.9.15. A vizsgált BRCA2 régió amplifikációja és szekvenálása**

Az előzőleg, teljes BRCA2 kódoló régió szekvenálással azonosított szubsztitúciót (c.7795G>T) a beteg különböző szövettípusainak sejtjeiben vizsgáltuk. Ehhez kétlépéses PCR reakció segítségével amplifikáltuk a vizsgálni kívánt régiót. Az első PCR reakcióhoz, a genomi DNS-ről történő amplifikációhoz a 5. táblázatban található kondíciókat használtuk:



Reagens	Végkoncentráció
10x Taq puffer	1x Taq puffer
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTP	2,5 mM
AmpliTaq Gold DNS polimeráz (ThermoFisher Scientific, kat.szám: 4311806)	1 egység
FW oligó (univerzális tag szekvenciákkal)	10 μM
Rev oligó (univerzális tag szekvenciákkal)	10 μM

5. táblázat: Az amplifikációhoz használt PCR mix összetétele, 20 μl végtérfogatra.

A PCR terméke 148 bp. Az alkalmazott PCR programot a 6. táblázat foglalja össze:

Hőmérséklet	Idő	Ismétlésszám
95°C	2 perc	1x
95°C	15 másodperc	25x
61°C	30 másodperc	
72°C	20 másodperc	
72°C	1 perc	1x

6. táblázat: Az amplifikációhoz használt PCR program

A második, indexelő PCR-hez az első reakcióból 1 μl-t használtunk templátként. A használt oligók hordozták az univerzális tag szekvencia komplementerét, valamint Illumina specifikus adaptor szekvenciákat az 5' végükön. A reakció terméke 288 bp hosszú. Az alkalmazott PCR reakció kondícióit a 7. táblázat foglalja össze:

Hőmérséklet	Idő	Ismétlésszám
95°C	2 perc	1x
95°C	10 másodperc	30x
70°C	30 másodperc	
72°C	20 másodperc	
72°C	1 perc	1x

7. táblázat: Az indexelő PCR kondíciói.

#### 5.9.16. Az indexelt amplikonok szekvenálása

Az újgenerációs szekvenáláshoz a minták minőségét Qubit HS kvantifikációs módszerrel mértük (ThermoFisher Scientific). A szekvenálást Illumina MiniSeq Mid Output kittel (300 cycles, kat.szám: FC-420-1004) végeztük a gyártó ajánlásának megfelelően.

#### 5.9.17. Az újgenerációs szekvenálás eredményének kiértékelése

A kiértékeléshez a CLC Genomics 3.6.5 (Qiagen) bioinformatikai szoftvert használtuk. Az illesztéshez használt szekvencia a BRCA2-206: RefSeq. NM\_000059, Transcript ID: ENST00000544455.5 volt. A variáns hívással a BRCA2 c.7795 pozícióban található vad, illetve mutáns allél arányát vizsgáltuk. Az átlagos leolvasások száma 287 (min.: 70, max.: 636) volt. A read-ek száma konzisztens volt a lefedettséggel, mivel kizárólag azokat a read-eket vettük figyelembe, amelyek hordozták a vizsgálni kívánt pozíciót is.

#### 5.9.18. Bioinformatikai analízis

A misszensz variánsok bioinformatikai predikciójához a PANTHER-PSEP<sup>102</sup>, a PMut<sup>103</sup> és az SNP&GO<sup>104</sup> szoftvereket alkalmaztunk. A BRCA1 VUS variánsokkal a szoftverek webfelületén futtattuk le a predikciós vizsgálatokat. Bemenő adatként a BRCA1 UniProt<sup>105</sup> azonosítóját (P38398) és az aminosavcserét adtuk meg a következő formátumban: AS1PozAS2 (AS1: az aminosav az adott pozícióban, Poz.: pozíció, AS2: az aminosav, amelyet a misszensz mutáció eredményez, például: V1804I).

A frameshift (a leolvasási keret eltolódását okozó) variáns vizsgálatához a MutationTaster2 programot használtuk az alábbi paraméterekkel:

Lekérdezés: ENST00000357654 (BRCA1 ID in the Ensembl Transcript)

Verzió: GChr37

Input: CCCAGAAGA[A/-]TTTATGCTCG (a delécióval szomszédos nukleotidok)

## 6. Eredmények

### 6.1. A mutációk azonosítása daganatos betegekből származó szövetmintákban

A molekuláris diagnosztikai vizsgálatra beérkezett emlő-, illetve petefészek daganatos betegek tumorszövet mintáinak feldolgozását követően a genomi DNS-en teljes BRCA1/2 kódoló régió újgenerációs szekvenálása segítségével azonosítottuk az alábbi mutációkat (8. táblázat):

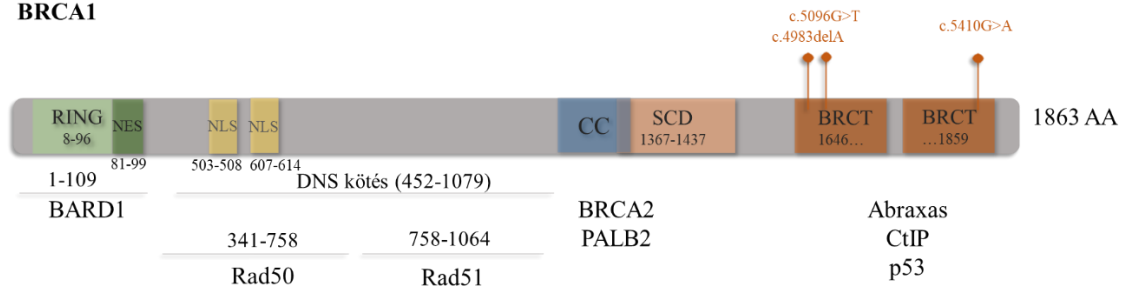
Gén	Exon/ intron	Érintett exon	Mutáció (DNS)	Mutáció (Fehérje)	Besorolás	Hatás
BRCA1	Exon	16	c.4983delA	p.E1661D fsTer16	VUS	Nem ismert
BRCA1	Exon	18	c.5096G>T	p.R1699L	VUS	Nem ismert
BRCA1	Exon	23	c.5410G>A	p.V1804I	VUS	Nem ismert
BRCA2	Exon	16	c.7795G>T	p.E2599Ter	Patogén	Trunkált fehérje

8. táblázat: Az azonosított BRCA géneket érintő mutációk. Munkánk során három, a BRCA1 gént érintő, ismeretlen klinikai szignifikanciájú variánst (VUS) azonosítottunk, ezek között található egy a leolvasási keret eltolódását okozó mutáció, valamint két aminosavcserevel járó misszensz variáns. Emellett egy patogén, korai STOP kodont eredményező BRCA2 variánst is kimutattunk egy vizsgált beteg tumorszövet mintájában.

A ClinVar és a BRCA Exchange adatbázis segítségével állapítottuk meg az egyes variánsokról, hogy azok lehetnek-e driverei a daganat kialakulásának, vagy sem. A három azonosított BRCA1 variáns esetében az adatbázisokban nem szerepelt egyértelmű információ a klinikai jelentőséget illetően ezek, mint VUS variáns, kerültek feltüntetésre. Mindhárom variáns a BRCA1 BRCT doménjeit érinti (8. ábra), a 18-as, 20-as és 23-as exont. Mivel szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy már a BRCA1 fehérje utolsó 11 aminosavának elvesztése is patogén variánst eredményez <sup>106</sup>, így a c.4983delA, a leolvasási keret eltolódását eredményező variáns esetén kísérletes bizonyíték hiányában is feltételezhető, hogy patogén variánst kódol. A misszensz variánsok esetében a predikció lényegesen bonyolultabb, nincs benne az a fajta szabályszerűség, mint a

BRCA1 frameshift (a leolvasási keret eltolódását okozó) mutációknál. Mindhárom azonosított VUS variánst egyrészt bioinformatikai predikciós szoftverek segítségével, másrészt laboratóriumi kísérlettel vizsgáltuk azok klinikai relevanciájának megállapítása érdekében.

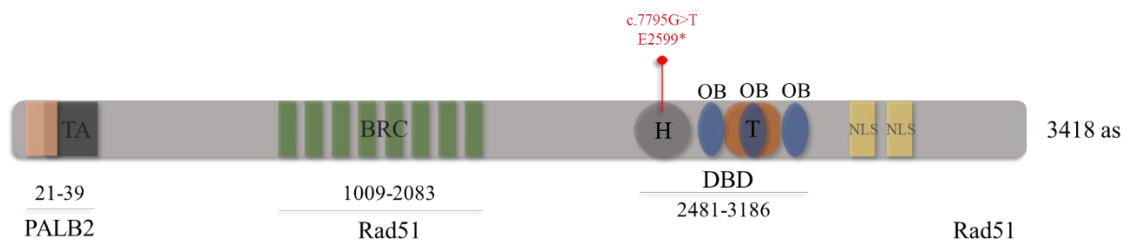
### BRCA1



8. ábra: Az azonosított BRCA1 VUS variánsok helyzete a kódoló régióban. Mindhárom azonosított VUS variáns a BRCA1 BRCT doménjeit érinti. A BRCT domén szükséges a fehérje megfelelő sejten belüli lokalizációjához, funkciójának betöltéséhez a homológ rekombinációs hibajavítás, a transzkripció szabályozás, valamint a sejtciklus ellenőrzőpontok szabályozásának folyamatában.

Az azonosított BRCA2 variáns a gén 16. exonját érinti, a 7795-ös pozícióban történő nukleotid csere (G>T) korai stop kodon megjelenéséhez és ezzel csonkolt fehérjetermék keletkezéséhez vezet. Mindez funkcióvesztéses fehérjét eredményez. Mind a BRCA Exchange, mind a ClinVar adatbázis alapján patogén variáns. Helyzetét a BRCA2 génen, illetve fehérjén a 9. ábra mutatja be:

### BRCA2



9. ábra: A c.7795G>T szubsztitúció lokalizációja a BRCA2 kódoló régióban. A mutáció a DNS kötő doménben található, az aminosavcsere okozó G>T szubsztitúció korai STOP kodon kialakulásához, végső soron trunkált, így funkciójában sérült fehérje kifejeződéséhez vezet.

## 6.2. Az azonosított patogén BRCA2 mutáció vizsgálata

### 6.2.1. A BRCA2 c.7795G>T mutáció vizsgálata a beteg tumoros és egészséges szövetblokkjaiban

A patogén BRCA2 variáns tumorszövet mintában történő azonosítását követően alaposabb vizsgálatnak vetettünk alá a betegből származó tumoros és egészséges FFPE (formalin fixált, paraffinba ágyazott) szövetblokkokat, szájnyalkahártya kenetet, illetve vérmintát (9. táblázat). Ezeket Sanger és újgenerációs szekvenálással vizsgáltuk párhuzamosan, összehasonlítva a mutáció detektálás megbízhatóságát. Először a beteg tumorszövet blokk mintáit vizsgáltuk. Az NGS eredménye alapján a tumorszövet blokkokban 77, illetve 78%-ban volt jelen a mutációt jelentő T allél a 7795-ös nukleotid pozícióban. A Sanger szekvenálás eredményeül kapott szekvenogramon a csúcsok (peak) méretének összehasonlításával körülbelül azonos T allél jelenlétet detektáltunk. Később további szövetminta típusokat, szájnyalkahártya kenetet, a petefészekből származó tumormentes, egészséges szövetállományt, és vérmintát vetettünk alá szekvenálásnak. Érdekes módon a beteg szájnyalkahártya kenet mintájában is jelen volt a mutáció, körülbelül a read-ek 20%-ban, a Sanger szekvenálás becslése is hasonló eredményt adott. Abban az esetben, ha a mutáció öröklött lenne, heterozigóta állapotot látnánk, tehát a mutációt jelentő T és a vad típust jelentő G allél 50-50%-ban lenne jelen. Mindez arra engedett következtetni, hogy a beteg nem heterozigóta a BRCA2 c.7795G>T tranzícióra, sokkal inkább egy mozaikos genotípus figyelhető meg. Annak érdekében, hogy a feltevésünk bizonyosságot nyerjen, további szövettípusokat is megvizsgáltunk, ahogy az már fentebb említésre került. A tumormentes, egészséges ováriumszövet mintában mindkét szekvenálási módszerrel a szájnyalkahártyából származó eredményekhez hasonlóan, körülbelül 20%-os mutáns T allél jelenlétet detektáltunk. Végezetül a betegől származó vérmintát is megvizsgáltuk, ahol 26%-os T allél jelenlétet mutattunk ki.

A három, egymástól független, eltérő csíralemez eredetű (szájnyálkahártya: ektoderma, vér és petefészek: mezoderma), egészséges szövetmintában hasonló, 20-25%-os arányban azonosítható a G>T szubsztitúció. Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a beteg nem heterozigóta, hanem mozaikos genotípust mutat a vizsgált variánsra.

Szövet típus	Sanger szekvenálás	Újgenerációs szekvenálás
Tumor 1		78%
Tumor 2		77%
Szájnyálkahártya 1		23%
Szájnyálkahártya 2		21%
Egészséges ovárium		17%
Vér		26%
Szájnyálkahártya (utód)		0%

9. táblázat: A *BRCA2* c.7795G>T pozíció vizsgálata különböző szövetminta típusokban, Sanger (a sárga keretek a mutáció nukleotid pozícióját jelölik) és újgenerációs szekvenálással (a mutációt jelentő T nukleotid aránya a 7795-ös nukleotid pozícióban) vizsgálva. A tumorszövet mintákban 77, illetve 78%-os arányban volt jelen a T allél, míg az egészséges, tumortól független szövetmintákban is 20-25%-os arányban azonosítottuk a mutációt jelentő T allélt. A körülbelül 1/4 -es arányból arra következtítettünk, hogy egy mozaikos esettel állunk szemben.

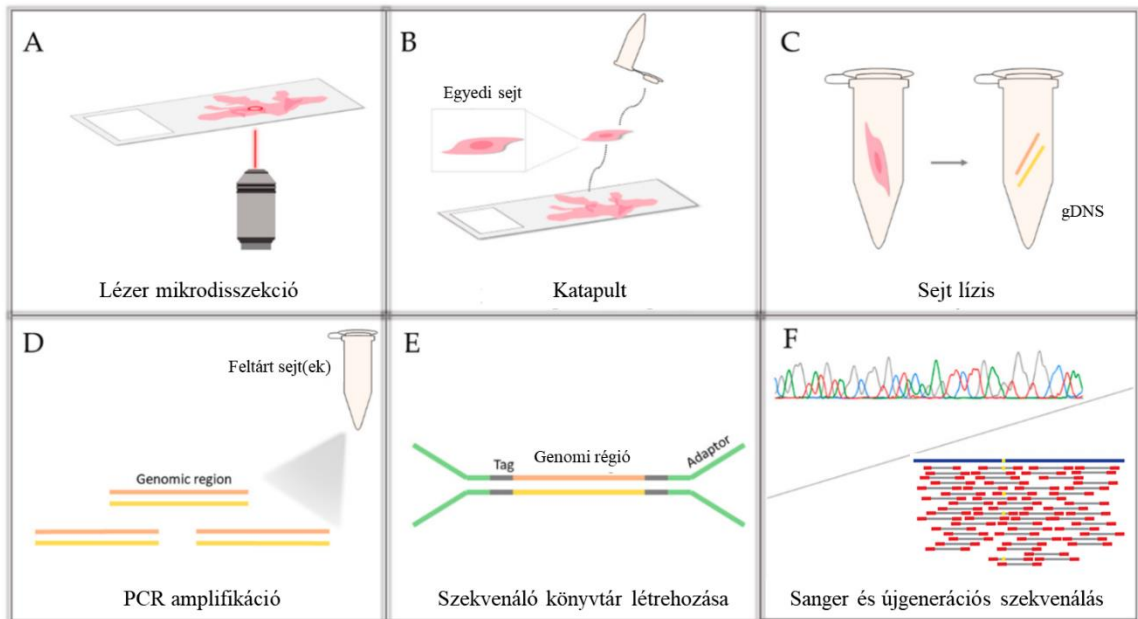
Továbbá lehetőségünk nyílt a beteg egyetlen leszármazottjának szájnyálkahártya mintáját is megvizsgálni, ebben a mintában a mutációt jelentő T allél nem volt jelen, mindez arra utal, hogy az utód nem örökölte a mutációt.

### **6.2.2. A BRCA2 c.7795G>T mutáció vizsgálata a beteg tumoros és egészséges szövetmintáinak egyedi sejtjein és sejtklaszterein**

A makrodisszekált szövetblokkok vizsgálatának eredménye egy átlag a genetikai hátteret illetően. Viszont ez önmagában nem elegendő a tumorsejt alpopulációk megismeréséhez vagy az esetleges jelenlévő ritka variánsok felfedéséhez, amelyet az egyszerre szekvenált nagy sejt-tömegből származó szekvencia információ elfedhet. Ennek kiküszöbölésére az egyszerre vizsgált sejtek száma csökkenthető egészen az egyedi sejtek szintjéig.

A munkánk során vizsgált BRCA2 c.7795G>T tranzíciót nem csupán szövetblokkokban vizsgáltuk, hanem egyedi sejtekben és 5-10 sejtet tartalmazó klaszterekben is. Ezen a konkrét eseten keresztül bemutatva a módszert, mely a későbbiekben a molekuláris diagnosztika eszköztárának része lehetne, kiegészítve a nagy sejtszámú tumorszövet blokkokból származó szekvenálási eredményeket.

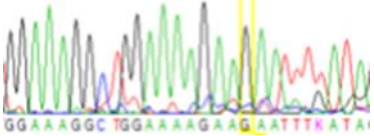
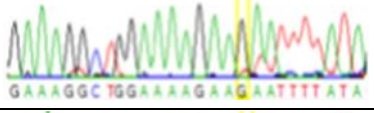
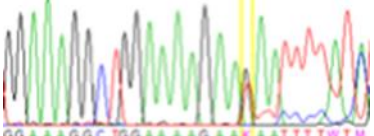

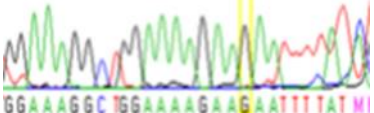
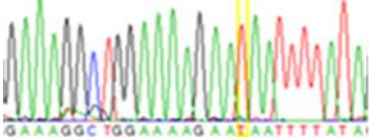
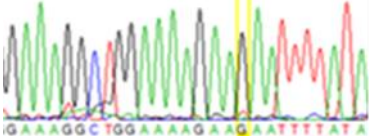
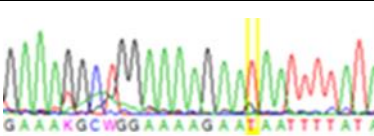
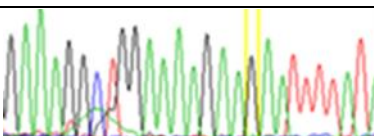
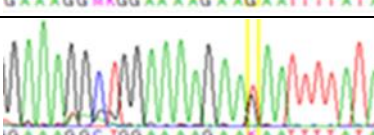
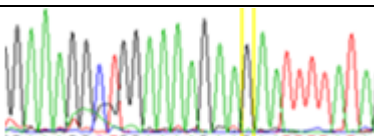
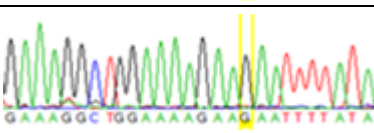
A klaszterek esetében feltételezzük, hogy az egymással szomszédos sejtek egymás leszármazottjai legalább részben, így ugyanaz a genetikai állomány több kópiában van jelen a mintákban, ezzel a kísérlet sikerességét növelve. A munkafolyamat során az egyedi sejtek és a sejtklaszterek izolációjához lézer mikrodisszekációs mikroszkópot használtunk. A kiválasztott sejteket lézer segítségével izoláltuk a minta többi részétől, és úgynevezett “katapult puffer” tartalmú mikrocentrifuga csövek kupakjába izoláltuk. A sejteket feltártuk, és a szövetblokkok esetében használt PCR amplifikációs lépéseket végeztük el, majd az amplikonokat Sanger és újgenerációs szekvenálással vizsgáltuk. A munkafolyamatot a 10. ábra foglalja össze:

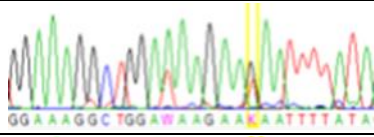
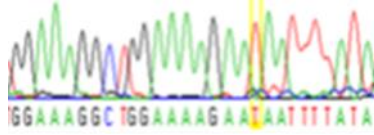
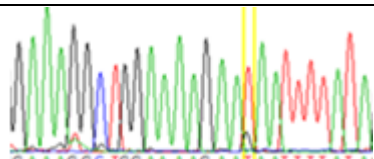
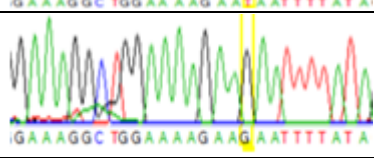
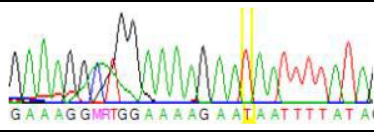
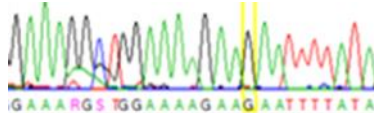


10. ábra: Az egyedi sejtek és 5-10 sejtet tartalmazó klaszterek esetén alkalmazott munkafolyamat sematikus ábrája. **A:** A vizsgálni kívánt sejtek izolációja fixált szövetmintából, lézer mikrodisszekcióval. **B:** A sejtek „katapultja” speciális puffert tartalmazó mikrocentrifuga csövek kupakjába. **C:** A sejtek feltárása. **D:** A mutációt hordozó BRCA2 genomi régió amplifikációja a szekvenáláshoz szükséges tageket is hordozó oligókkal, (E) A második amplifikációs lépés Illumina specifikus adaptorokat is hordozó primerekkel. **F:** A minták szekvenálása párhuzamosan Sanger és újgenerációs szekvenálással.

Annak érdekében, hogy egy tumor vizsgálata során többlet információhoz juthassunk, hogy az alpopulációkat és azok megoszlását, az esetleges jelenlévő ritka variánsokat azonosíthassuk és vizsgálhassuk, szükséges a kiindulási anyag, a mintában jelenlévő sejtek számának csökkentése. Tehát nagy sejtömegek helyett egyedi sejtek, illetve néhány sejtet tartalmazó sejt klaszterek vizsgálatával többlet információhoz juthatunk. Dolgozatomban a módszert a vizsgált BRCA2 mutációra nézve mozaikos genotípust mutató eseten keresztül ismertettük és validáltuk. Az egészséges egyedi ovárium sejtek Sanger szekvenálása során azonosítottunk heterozigóta és vad típusú sejteket egyaránt (10. táblázat). A szövettípus 5-10 sejtet tartalmazó klaszterében körülbelül 30%-os T allél jelenlétet detektáltunk. A tumorszövet klaszterek között (10. táblázat) találtunk kettőt, melyben kizárólag a mutációt jelentő T allél volt kimutatható, ami arra utal, hogy korábban megtörtént a heterozigóta állapot elvesztése a tumorban (LOH). Emellett azonosítottunk heterozigóta tumorklasztert, melyben még felfedezhető 10-20%-os arányban a vad típusú allél is, valamint kizárólag vad típusú G allélt tartalmazó klasztereket is, mely valószínűleg technikai hiba következménye.



Szövettypus (becsült sejtszám)	Sanger szekvenálás	Azonosított allél
Egészséges ovárium (1 sejt)		G
Egészséges ovárium (1 sejt)		G
Egészséges ovárium (1 sejt)		G/T
Egészséges ovárium (1 sejt)		G
Egészséges ovárium (1 sejt)		G
Egészséges ovárium (1 sejt)		T
Egészséges ovárium (1 sejt)		G
Egészséges ovárium (1 sejt)		T
Egészséges ovárium (1 sejt)		G
Egészséges ovárium (1 sejt)		G/T
Egészséges ovárium (1 sejt)		G
Egészséges ovárium (1 sejt)		G

Szövettypus (becsült sejtszám)	Sanger szekvenálás	Azonosított allél
Egészséges ovárium (5-10 sejt)		G/T
Tumor (5-10 sejt)		T
Tumor (5-10 sejt)		G/T
Tumor (5-10 sejt)		G
Tumor (5-10 sejt)		T
Tumor (5-10 sejt)		G

10. táblázat: A vizsgált egyedi sejtek és sejtklaszterek Sanger szekvenálási eredménye. Az egyedi, egészséges ováriumszövetből származó sejtek esetén a vártnak megfelelően vad típusú, valamint a BRCA2 mutációra heterozigóta eredményt kaptunk. Az egészséges ováriumszövetből származó klaszter heterozigóta állapotot mutat, míg a tumorszövet klaszterek közt található homozigóta mutáns, tehát ezekben a sejtekben már valószínűleg végbement a vad típusú kópia elvesztése, heterozigóta, illetve tisztán vad típusú is, amely valószínűleg technikai hiba eredménye.

Újgenerációs szekvenálással is megvizsgáltuk az egészséges ovárium szövetből származó egyedi sejteket és sejtklasztereket, valamint tumorsejt klasztereket (11. táblázat). Egyedi tumorsejtek analízisére nem került sor, mivel nem szolgált volna többlet információval a mozaikos esetet, valamint a munkafolyamat validálását illetően.

Azonosító	Szövet/sejtszám	T	G
Norm-01	Egészséges ovárium 1	-	100%
Norm-02	Egészséges ovárium 1	7%	92%
Norm-03	Egészséges ovárium 1	9%	90%
Norm-04	Egészséges ovárium 1	79%	21%
Norm-05	Egészséges ovárium 1	57%	42%
Norm-06	Egészséges ovárium 1	94%	5%
Norm-07	Egészséges ovárium 1	-	100%
Norm-08	Egészséges ovárium 1	-	100%
Norm-09	Egészséges ovárium 1	53%	46%
Norm-10	Egészséges ovárium 1	-	100%
Norm-11	Egészséges ovárium 1	-	100%
Norm-12	Egészséges ovárium 1	7%	92%

Azonosító	Szövet/sejt	T	G
Norm_cl-01	Egészséges ovárium 5-10	43%	57%
Tum_cl-01	Tumor 5-10	82%	18%
Tum_cl-02	Tumor 5-10	2%	97%
Tum_cl-03	Tumor 5-10	87%	12%
Tum_cl-04	Tumor 5-10	99%	-
Tum_cl-05	Tumor 5-10	4%	95%

11. táblázat: Vizsgált egyedi sejtek és sejtklaszterek újgenerációs szekvenálási eredménye (Normál: egészséges ováriumszövet). Ahogyan az a Sanger szekvenálás eredményeinél megfigyelhető volt, úgy NGS esetén is az egyedi egészséges ováriumsejtek esetén is heterozigóta, valamint vad típusú sejteket azonosítottunk. Néhány sejt esetében torzult allélarány figyelhető meg, mely technikai hiba eredménye lehet. Ugyanez a torzult arány a Sanger szekvenálás néhány mintájánál is megfigyelhető. A normál klaszter heterozigóta állapotot mutat, míg a tumorszövetből származó klaszterek között található közel vad típusú, illetve homozigóta mutáns is.

Ahogyan a Sanger szekvenálás mutatta, úgy az NGS eredménye alapján is az egészséges ováriumsejt klaszter esetében közel heterozigóta állapot rajzolódik ki, míg az egyedi sejtek 42 százaléka vad típus és 16% heterozigóta. Több minta esetén (Norm-02, 03, 04, 06, 12) torzult G/T arány figyelhető meg, mely egyedi diploid sejtek esetén nem lehetséges kimenetel. A torzult arányt eredményezheti technikai probléma, mint például az, hogy a lézer mikrodisszekció során nem egyedi sejtek kerültek izolálásra. További magyarázat lehet a PCR amplifikáció esetleges hibája. Az „allél kilökődés” (allele drop out) egy ismert jelenség, mely során a DNS polimeráz az egyik allélt valamilyen okból kifolyólag jobban preferálja az első néhány amplifikációs ciklus során, ezzel mesterségesen eltolva a két allél arányát egymáshoz képest<sup>107</sup>. Hasonló, nem várt allél arány figyelhető meg a Tum\_cl-02-es és a Tum\_cl-05-ös mintánál, mindezt a Sanger szekvenálás is igazolta (10. táblázat). Mindkét minta esetében nem várt módon alacsony a mutációt jelentő T allél reprezentáltsága. Itt is lehet az allél drop out jelenség a magyarázat, viszont valószínűleg az arány eltolódását ez esetben az okozhatta, hogy az

izolálni kívánt sejtek kiválasztásakor az egyik genotíusból több sejt került kiválasztásra, így az arányt mesterségesen eltolva.

### 6.2.3. A különböző szövetminta típusok amplifikálhatósága és szekvenálhatósága

FFPE minták használata a molekuláris onkológiai diagnosztikában rutinszerű. Hátránya viszont, hogy a formalinnal történő fixáció a sejtekben DNS-fehérje keresztkötéseket, illetve DNS kettősszál töréseket hoz létre. Ez befolyásolja a PCR amplifikáció hatékonyságát. Ezenfelül a lézerrel történő izoláció, valamint maga a katapult is negatívan befolyásolja az amplifikálhatóságot és a szekvenálhatóságot, mivel a lézerrel történő izoláció és az energia, amely segítségével a sejtet a mikrocentrifuga cső kupakjába juttatjuk, a DNS-ben sérüléseket okozhat. A vizsgált szövetdarab mérete, az abban található kis sejtszám, bár precízebb információval szolgálhat, sokkal nehezebben kezelhető. Egyetlen sejt elvesztése a munkafolyamat során sokkal nagyobb hatással van a végeredményre, mint egy több száz, vagy több ezer sejtet tartalmazó szövetblokk esetén. Az egyedi sejtek és 5-10 sejtés tumor, illetve egészséges ováriumszövet klaszterek amplifikálhatósága és szekvenálhatósága a 12. táblázatban látható:

Szövettípus	Sejtszám	Össz mintasám	Amplifikálhatóság		Szekvenálhatóság	
			db	%	db	%
Egészséges ovárium	5-10	2	1	50	1	100
Egészséges ovárium	1	20	12	60	12	100
Tumor	5-10	10	5	50	5	100

12. táblázat: A vizsgált minta típusok amplifikálhatósága és szekvenálhatósága. Mind az egyedi sejtek, mind pedig a klaszterek esetében jól láthatóan a PCR amplifikáció a limitáló lépés, azok a minták, amelyek amplifikálhatók, szekvenálhatók is.

A klaszterek esetén mind az egészséges ovárium-, mind a tumorszövet mintákból 50%-os hatékonysággal tudtuk amplifikálni a vizsgálni kívánt BRCA2 genomi régiót, míg az egyedi egészséges ováriumszövet sejtek esetében ez az arány 60% volt. Minden olyan minta, amely esetén a PCR amplifikáció sikeres volt, szekvenálhatónak is

bizonyult. Ebből arra következtethetünk, hogy a minták feldolgozásának kritikus lépései a genomi DNS-ről történő amplifikáció, illetve az azt megelőző sejt izoláció.

#### 6.2.4. A szövetblokk és egyedi sejt/sejtklaszter szekvenálás eredményének összehasonlítása

Ahogy az a 13. táblázat is szemlélteti, az újgenerációs szekvenálás eredményei alapján 10-20%-os eltérés figyelhető meg a G/T allél reprezentáltságban az azonos szövetből származó mikro- és makrodisszekált minták esetén. Ez az arány a Sanger szekvenálás esetén körülbelül azonos volt.

Szövet típus		Mikrodisszekció		Makrodisszekció	
		Sejtszám/minta	Mintaszám	A mutációt jelentő T allél aránya a BRCA2 7795-ös nukleotid pozíciójában	
FFPE	Egészséges ováriumszövet	1	12	26%	17%
	Tumoros ováriumszövet	5-10	5	55%	78%

13. táblázat: Az újgenerációs szekvenálás eredményének összefoglalása a vizsgált minta típusok esetén. 10-20%-os különbség figyelhető meg G/T allélarányban a mikro-, illetve makrodisszekált minták között.

Mindebből arra következtethetünk, hogy a bevitt minta méretének (a mintában található sejtek számának) csökkentésével pontosabb eredményt kaphatunk, adott esetben egy daganat összetételével kapcsolatban, vagy épp egy ritka, mozaikos eset kapcsán.

### 6.3. Az ismeretlen klinikai szignifikanciájú BRCA1 variánsok vizsgálata

#### 6.3.1. Az ismeretlen klinikai szignifikanciájú BRCA1 variánsok vizsgálata bioinformatikai analízis segítségével

A bioinformatikai analízist az ACMG/AMP (American College of Medical Genetics/ American College of Pathologists) ajánlásának megfelelően kiviteleztek, ennek értelmében több szoftverrel párhuzamosan vizsgáltuk az azonosított BRCA1 VUS mutációkat<sup>108</sup>. A misszensz variánsok vizsgálatához az alábbi három szoftvert használtuk: PANTHER-PSEP, PMut, SNP&GO. Működésük eltérő algoritmuson alapul és eltérő tulajdonságok kapnak nagyobb hangsúlyt annak érdekében, hogy megkülönböztessék a patogén, illetve benignus variánsokat. A PMut és az SNP&GO gépi tanuláson alapuló szoftverek, számos tulajdonságot vesznek figyelembe, egyebek mellett az adott pozíciójú aminosav konzerváltságának fokát, valamint az SNP&GO a Gene

Ontology kategóriákat is. A PANTHER-PSEP ettől eltérően egy egyedi megközelítést, az úgynevezett evolúciós prezervációt alkalmazza.

Mindhárom *in silico* prediktor egybehangzó eredménnyel szolgált (14. táblázat). Az R1699L (c.5096G>T) VUS variánst mindhárom szoftver daganat kialakulása szempontjából kockázatosnak ítélte meg, míg a V1804I (c.5410G>A) VUS variáns mindhárom szoftver szerint valószínűleg benignus, illetve neutrális variáns. Kontrollként több, ismert patogén és egy ismert benignus variánst használtunk, többek között azokat a kontroll variánsokat, amelyeket az élesztő alapú funkcionális kísérletben is alkalmaztunk. Ezek eredménye a vártnak megfelelt, viszont az SCPA kísérletben kontrollként alkalmazott c.5559C>A variánst ebben a bioinformatikai analízisben nem tudtuk kontroll mutációként alkalmazni, ezek a szoftverek korai STOP kodont generáló mutációkat nem tudnak kezelni. Így a c.5559C>A variáns esetében a ClinVar adatbázisra támaszkodtunk, a rendelkezésre álló eredmények és publikációk alapján, melyekben ezt a variánst, mint a kísérlet kontrollját alkalmazzák <sup>84</sup>.

Mutáció	PANTHER-PSEP	PT	PMut	Pontszám	SNPs&GO	Pontszám	RI
V1804I c.5410G>A	Prediktáltan benignus	30	Neutrális	0.0504	Neutrális	0.064	9
R1699L c.5096G>T	Prediktáltan patogén	1628	Patogén	0.86	Betegség	0.864	7
Q356R* c.1067A>G	Prediktáltan benignus	176	Patogén	0.75	Neutrális	0.064	9
C61G* c.181T>G	Prediktáltan patogén	1628	Patogén	0.84	Betegség	0.570	1
A1708E* c.5123C>A	Prediktáltan patogén	1036	Patogén	0.86	Betegség	0.883	8
M1775R* c.5324T>G	Prediktáltan patogén	455	Patogén	0.86	Betegség	0.890	8
L1764P* c.5291T>C	Prediktáltan benignus	176	Neutrális	0.44	Betegség	0.851	7

14. táblázat: A PANTHER-PSEP, a PMUT és az SNP&GO bioinformatikai szoftverekkel történt BRCA1 variáns predikciós vizsgálat eredménye. \*Ismert, bizonyítottan patogén, illetve benignus variánsok, amelyek a VUS variánsokkal együtt részt vettek a predikciós vizsgálatban. \*PT: preservation time (Prezervációs idő, millió év), RI: reliability index (megbízhatósági index, 1-9-ig terjedő skála, minél nagyobb a szám, annál megbízhatóbb a predikció eredménye.

Mindegyik program a megfelelő kategória mellett (Prediktáltan patogén/Prediktáltan benignus vagy Betegség/Neutrális) egy predikciós pontszámot is megad, amely információval szolgál a predikció megbízhatósága szempontjából. A PMut és az

SNP&GO esetében ezek az értékek 0 és 1 között változnak (>0,5: patogén, <0,5: benignus), minél távolabb esik a pontszám a középértéktől, annál pontosabb az eredmény.

A PANTHER-PSEP prezervációs idő (PT- preservation time) alapján kategorizál. Tehát évmilliókban kifejezve vizsgálja azt az eltelt időt, amióta az adott pozícióban található aminosavat „megőrizte” az evolúció. Minél régebben konzerválódott az adott pozíció, annál nagyobb a valószínűsége annak, hogy az itt bekövetkező aminosavcsere káros következményekkel fog járni. A káros hatás valószínűsége (Probability of deleterious effect- Pdel) alapján három kategóriát különböztetnek meg: valószínűleg káros: >450 millió év, talán káros: 450 millió év<X>200 millió év, valószínűleg benignus: <200 millió év.

A misszensz variánsok mellett egy delécióval járó, a leolvasási keretet eltoló mutációt is azonosítottunk, amely klinikai szignifikanciája szintén nem ismert. Ez a mutáció a c.4983delA/ p.E1661Dfs\*16. A fenti szoftverek kizárólag misszensz variánsok predikciójához alkalmazhatók, frameshift mutációk vizsgálatára nem alkalmasak, ezért ennek pontosabb megismeréséhez a MutationTaster2-t<sup>109</sup> választottuk, melyet gyakran használnak kutatásban és a klinikumban egyaránt. Eredményként a szoftver a vizsgált variánst a „Káros” csoportba sorolta, a p.E1661Dfs\*16 frameshift variáns funkcióvesztést okoz (15. táblázat), ahogyan azt a szakirodalmi ismeretek alapján várnánk.

<b>Mutáció</b>	<b>Szoftver</b>	<b>Predikció</b>	<b>További információ</b>
c.4983delA (E1661Dfs*16)	MutationTaster2	Káros	Funkcióvesztés

15. táblázat: A BRCA1 c.4983delA VUS variáns bioinformatikai vizsgálatának eredménye. A mutáció helyzetéből és jellegéből adódó általunk várt kimenetelnek a predikció eredménye is megfelelt.

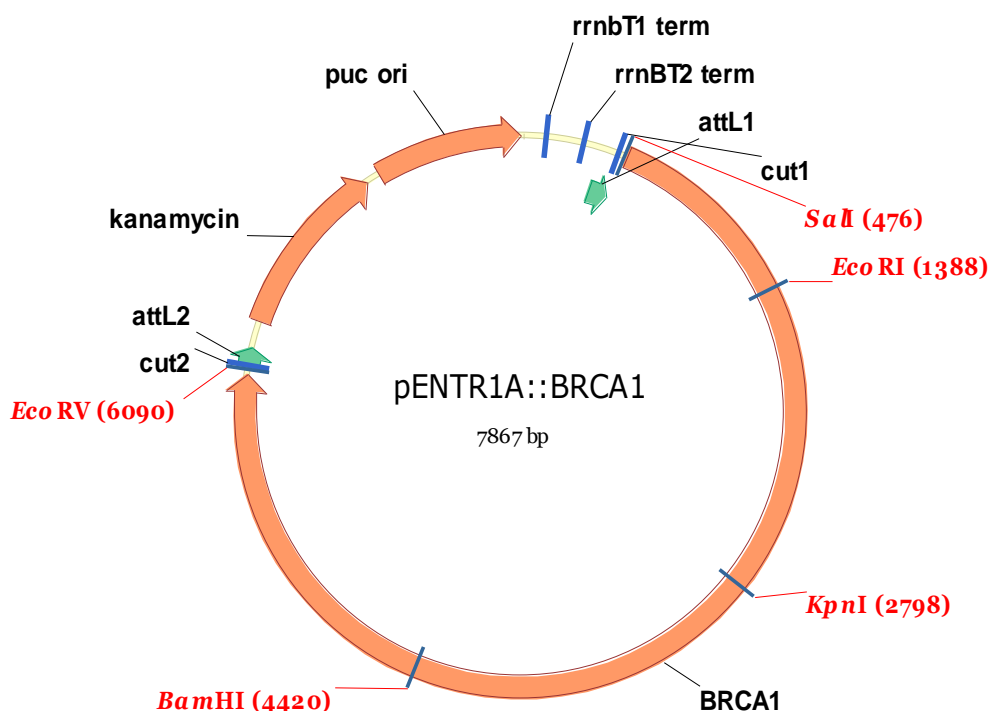
### 6.3.2. A BRCA1 VUS mutációkat hordozó plazmid konstrukciók előállítása

A funkcionális kísérletben használt BRCA1 VUS, illetve kontroll, exonba térképeződő mutációkat PCR reakció segítségével állítottuk elő BRCA1 cDNS-t hordozó entry vektorban (11. ábra). A polimeráz hibájából adódóan a PCR amplifikáció eredményezhet nem kívánt háttérmutációkat, ezért a hatékony mutagén PCR reakció érdekében szükséges volt az amplifikálandó BRCA1 cDNS fragment hosszát csökkenteni. Ehhez a pENTR1A vektorban lévő BRCA1 cDNS-t négy fragmentre bontottuk restrikciós endonukleázok segítségével: *SalI-EcoRI* (1-907 nt), *EcoRI-KpnI*



(908-2317 nt), *KpnI-BamHI* (2318-3939 nt), *BamHI-EcoRV* (3940-5592 nt), majd a kapott fragmenteket BlueScript vektorokba ligáltuk. A teljes BRCA1 cDNS-t felosztottuk és mindegyik fragmenthez elkészítettük a megfelelő BlueScript vektort is, mivel a jövőben is tervezzük alkalmazni a módszert további BRCA1 VUS variánsok vizsgálatára, amelyek nem feltétlenül a BRCT doméneket érintik.

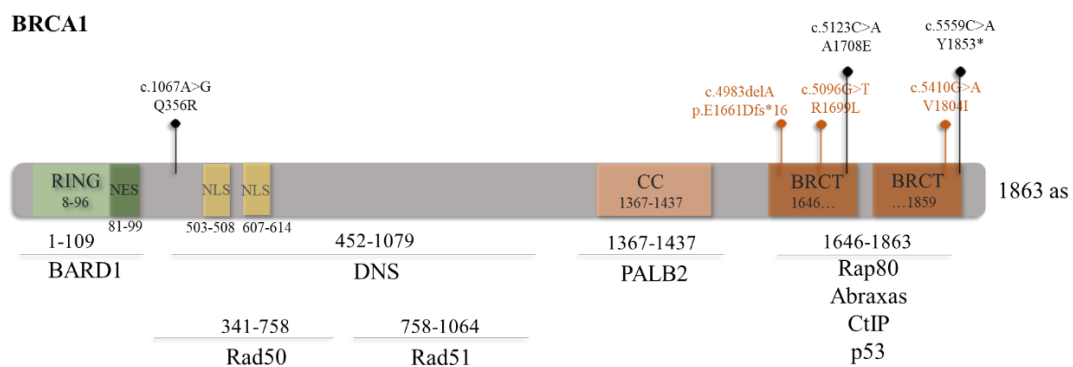
Ezt követően ezeken a kisebb BRCA1 fragmenteken végeztük el a mutagén PCR reakciókat, amihez az Anyag és módszerek fejezet 5.5 pontjában felsorolt mutagén PCR oligókat, illetve 5.9.3 pontjában leírt PCR programokat használtuk. A megfelelő mutációt hordozó BRCA1 darabokat teljes hosszában megszekvenáltuk majd a fent említett restriktív endonukleázokkal izoláltuk és visszaillesztettük az entry vektorba.



11. ábra: A BRCA1 cDNS-t hordozó entry vektor térképe a fragmentek létrehozásához használt restriktív endonukleázok hasítóhelyeivel.

A vizsgálni kívánt VUS variánsok mellett a vad típusú BRCA1 cDNS-t használtuk, illetve ismert benignus, valamint patogén variánsokat állítottunk elő a funkcionális kísérlethez. Az egyes variánsok pozícióját a 12. ábra szemlélteti:

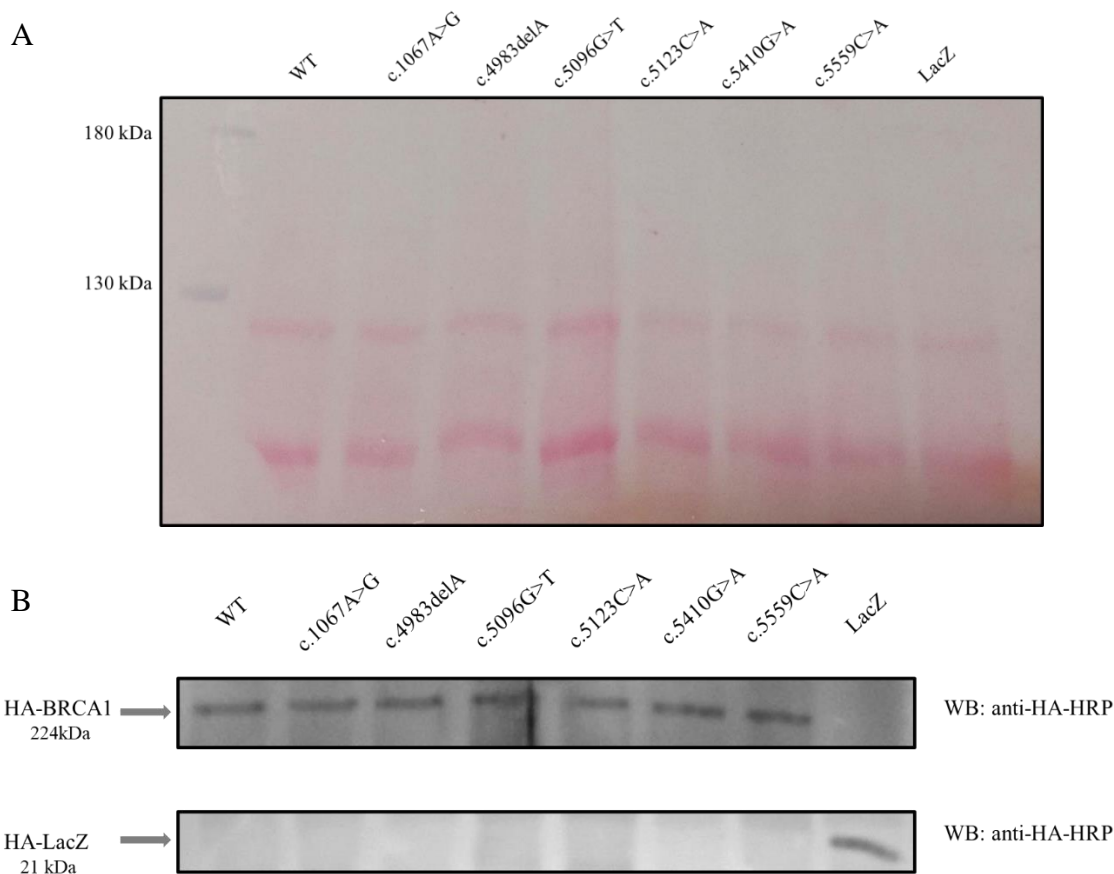




12. ábra: Az előállított BRCA1 mutációk pozíciója a BRCA1 kódoló régióban. A három vizsgálni kívánt VUS variáns (narancs) mellett kontroll mutációkat (fekete) is előállítottunk, két BRCT doménjében patogén mutációt hordozót, illetve egy ismert benignus BRCA1 variánst. \*: a leolvasási keret eltolódása miatt létrejött korai stop kodon

### 6.3.3. A BRCA1 VUS variánsok expressziójának vizsgálata élesztő sejtekben

Annak érdekében, hogy biztosak lehessünk a funkcionális kísérlet eredményeit illetően, szükséges volt ellenőrizni az egyes variánsok expressziójának mértékét, tehát megbizonyosodni arról, hogy az eredményeink nem a kifejeződés mértékének különbségéből, hanem valóban a variánsok funkcióképességének különbségéből adódnak. Ehhez azonos élesztősejt mennyiségből kiindulva Western blot analízist végeztünk ennek eredménye a 13. ábrán látható:



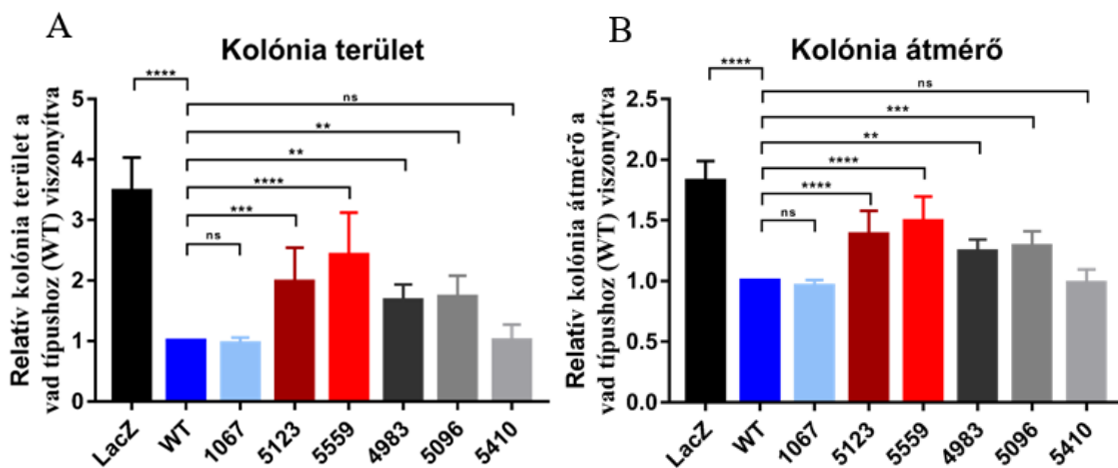
13. ábra: A vizsgált BRCA1 variánsok expressziós szint ellenőrzése Western blot segítségével. **A:** Az egyes BRCA1 variánsokat expresszáló élesztőminták Ponceau S festése nitrocellulóz membránon. **B:** A Western blot analízis eredménye, a kísérlet alapján az egyes variánsok közel azonos mértékben fejeződnek ki.

#### 6.3.4. A BRCA1 VUS variánsok hatása a kolóniaméretre *S. cerevisiae*-ben

A vad típusú humán BRCA1 gátolja az emlő és petefészek epiteliális tumorsejtek növekedését<sup>110</sup>. Ebben a fehérje C-terminális régiójában található BRCT doméneknek van szerepe, mivel a fehérje utolsó, mindössze 11 aminosavának deléciója növeli az emlődaganat kialakulásának kockázatát<sup>106</sup>. Hasonló jelenséget figyeltek meg élesztő sejtek esetében is, ugyanis a vad típusú humán BRCA1 expressziója gátolta az élesztősejtek növekedését<sup>83</sup>. Ezzel szemben a BRCT domének valamelyikén, a funkcióra hatást gyakorló mutációt hordozó variánsok esetében normál méretű élesztő kolóniák detektálhatók. Tehát az úgynevezett Small Colony Phenotype Assay (kis kolónia fenotípus vizsgálat) vagy SCPA a BRCT domének (1651-1863 aminosavak) funkció képességének vizsgálatára ad lehetőséget élesztő sejtekben. Mivel az általunk vizsgálni kívánt BRCA1 VUS mutációk mindegyike a fehérje BRCT doménjeit érinti, így, mint funkcionális kísérlet, ezt a jól bevált, gyors, könnyen kivitelezhető, megfelelő mértékben érzékeny és specifikus kísérletet választottuk. Így lehetőséget kaptunk arra, hogy a

predikció eredményét az élő szervezetben kiváltott hatással hasonlítsuk össze az egyes variánsok esetén.

Kísérleteink során a különböző VUS variánsokat hordozó élesztő expressziós vektorokat transzformáltuk Hfc7 élesztő törzs sejtjeibe, majd a lemezre kiszélesztett, felnőtt kolóniákat mértük meg, és hasonlítottuk össze a kontrollként használt BRCA1 variánsokat kifejező kolóniák méretével. Eredménye a 14. ábrán látható. Mind a kolóniák területét (A), mind pedig kolóniák átmérőjét (B) összehasonlítottuk az egyes variánsok esetén. A kísérletben a vad típusú BRCA1 (WT) mellett egy ismert benignus variánst, a c.1067A>G tranzíciót, illetve két bizonyítottan patogén, a BRCT doméneket érintő variánst, a c.5123C>A és c.5559C>A tranzíciót alkalmaztunk kontrollként, valamint abszolút negatív kontrollként a LacZ-t ugyanazon a vektor vázon.



14. ábra: Az élesztő kis kolónia fenotípus módszer eredményeinek összefoglalása. **A:** A kolóniák átlagos területe a különböző variánsok esetén, összehasonlítva a vad típusú BRCA1-et kifejező élesztő kolóniák átlagos területével. **B:** A kolóniák átlagos átmérője a különböző variánsok esetén, összehasonlítva a vad típusú BRCA1-et kifejező élesztő kolóniák átlagos átmérőjével. Kétirányú ANOVA statisztikai vizsgálatot végeztünk a GraphPad Prism 7.0 programcsomag segítségével. A grafikonokon a hibasávok a szórást (SD: Standard Deviation) jelölik. (nem szignifikáns (ns):  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ ). LacZ: abszolút negatív kontroll, WT: vad típusú BRCA1, 1067: c.1067A>G, 5123: c.5123C>A, 5559: c.5559C>A, 4983: c.4983delA, 5096: c.5096G>T, 5410: c.5410G>A

Eredményeinket minden esetben a vad típushoz viszonyítottuk. Ez alapján ahogyan vártuk, a benignus kontroll variáns a vad típusal közel azonos, kis kolóniaméretet eredményezett, míg a patogén kontroll variánsok szignifikánsan nagyobbakat. Bár az üres kontrollhoz képest ezeknél a variánsoknál is mérhető volt bizonyos mértékű kolónia méret csökkenés, ez azonban magyarázható önmagában a nagyméretű humán BRCA1 fehérje jelenlétével is az élesztő sejtekben. A három vizsgált VUS variáns, a c.4983delA

(E1661Dfs\*16), a c.5096G>T (R1699L) és a c.5410G>A (V1804I) a bioinformatikai analízis eredménye alapján vártak megfelelő végeredményt mutatott. A c.5410G>A tranzíció az élesztő kiskolónia fenotípus kísérlet alapján is benignus variánsnak bizonyult, ugyanis közel a vad típussal azonos mértékben akadályozta az élesztő kolónia növekedését, amely működőképes BRCT doménekre utal a fehérjében. Ezzel szemben a leolvasási keret eltolódásával járó c.4983delA és a misszensz variáns c.5096G>T a patogén kontroll variánsokhoz hasonlóan kevésbé befolyásolta az élesztősejtek növekedését és mindkét variáns jelenléte a vadtypusnál szignifikánsan nagyobb méretű kolóniákat eredményezett, amiből arra következtettünk, hogy mindkét variáns esetében a BRCT domének nem képesek hiánytalanul funkcionálni. Az expresszió mértékét ellenőrző Western blot kísérlet alapján pedig kijelenthetjük, hogy eredményeinket valóban az egyes variánsok működőképességbeli különbsége adja, nem a kifejeződés eltérő mértéke (6.3.3 fejezet).

## 7. Diskusszió

Napjainkban a daganatos megbetegedések a vezető halálokok közé tartoznak világszerte. Genetikai eredetű betegség lévén, a DNS állományban bekövetkező változások felelősek a sejtek klonális expanziójáért és malignáns transzformációjáért, ezek következményeként a daganatra genetikai heterogenitás jellemző. A tumorevolúciót gyakran hasonlítják a darwini szelekcióhoz, mivel bizonyos genetikai változások, például onkogének aktiváló, vagy tumorszupresszorok inaktiváló mutációi szelektív előnyt biztosítanak a sejt számára. Jól ismert tumorszupresszor gének a BRCA1 és BRCA2, melyek patogén variánsai központi szerepet játszanak az emlő és/vagy petefészek daganatok kialakulásában.

Mindkét BRCA gén hozzájárul a genom integritásának megőrzéséhez azáltal, hogy a sejt DNS sérülésre adott válaszreakciójának (DDR) számos pontján nélkülözhetetlen szerepet játszanak. A DNS kettősszálú törésének hibamentes, homológ rekombinációs hibajavításában több komplexen keresztül vesznek részt. A BRCA1 a sérülés felismerésében, a szabad DNS végek 5' szál visszaemésztésében, valamint a BRCA2-vel komplexet alkotva a homológ rekombináció központi szereplőiként, a Rad51 sérüléshez lokalizálásában és a Rad51-függő rekombináció iniciálásában vesznek részt. A BRCA fehérjék emellett a kettősszálú törések NHEJ útvonalon keresztül történő javításában, a sejtciklus ellenőrzőpontjainak szabályozásában, illetve a transzkripció szabályozásban is szerepet játszanak. Mindezek eredményeként, a BRCA gének inaktiváló mutációi a sejtben a mutációk felhalmozódásához vezetnek, mely újabb lépés a daganatos elváltozás kialakulásának irányába.

A BRCA1/2 mutációi által irányított tumorigenezisnek két típusa van, az öröklött és a sporadikus típus. Öröklött BRCA tumorigenezis esetén az érintett BRCA gén egyik alléljának patogén mutációja csíravonal eredetű, míg a másik allél a tumorigenezis során a szomatikus sejtekben inaktiválódik. A BRCA1 és BRCA2 csíravonal eredetű mutációi felelősek legnagyobb részt az öröklött emlő és petefészek daganat szindrómás (HBOCS) esetekért. Ezek a mutációk drasztikusan megnövekedett kockázatot jelentenek az emlő és/vagy petefészek daganat kialakulására már fiatal korban. Sporadikus tumorigenezis esetén mindkét BRCA allél a szomatikus sejtekben veszíti el működőképességét.

Napjainkban elérhető a hatékony, személyre szabott daganatterápia, melyhez a molekuláris diagnosztika rutinszerű alkalmazása nyújt segítséget. A daganat kialakulásáért felelős driver gének azonosítása lehetővé teszi a megfelelő terápiás

módszer kiválasztását, a daganat hatékonyabb kezelését, egyben csökkentve a káros következmények kockázatát. Viszont a jelenleg alkalmazott, tumorszövetblokkokon végzett vizsgálat homogén egészként kezeli a daganatot, eredménye csupán átlagolt képet ad annak genetikai háttéréről, így lényeges információ kerülhet elfedésre. A BRCA gének esetében a molekuláris diagnosztika javarészt direkt szekvenáláson alapul, mindez nem csupán a már kialakult daganat genetikai háttérének feltérképezését szolgálja, hanem a potenciálisan csíravonal mutációt hordozó, HBOCS betegek időben történő azonosítását és tájékoztatását is.

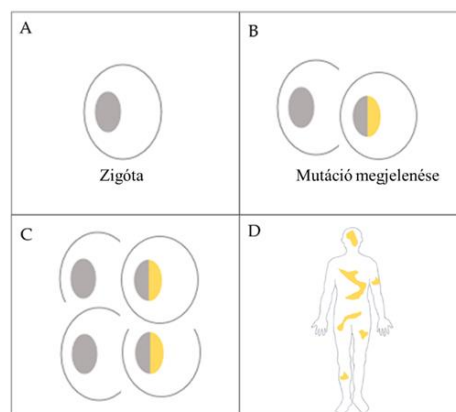
Mindkét fehérje multidomén szerkezetű, kódoló génjük polimorf, az ezekben azonosított mutációk döntő többsége az expresszió elvesztésével, vagy a fehérje csonkolódásával jár. Mind a BRCA1, mind a BRCA2 esetében számos misszensz variánst, illetve in-frame (a leolvasási keret eltolódását nem okozó) deléciókat, inszerciókat is azonosítottak. Ezek a variánsok jelentik a legnagyobb kihívást a klinikai kockázat értékelés szempontjából, hiszen ezeknek a variánsoknak nem ismert a fehérje működésére gyakorolt hatása. Ezért elegendő rendelkezésre álló statisztikai adat hiányában az ismeretlen klinikai szignifikanciájú variánsok (VUS) további, bioinformatikai módszereken és funkcionális kísérleteken alapuló vizsgálata szükséges a megfelelő klinikai menedzsmenthez.

Munkánk során 4, a BRCA géneket érintő variánst azonosítottunk daganatos betegekből származó tumorszövet mintákban, direkt újgenerációs szekvenálás segítségével. A három azonosított BRCA1 variáns klinikai jelentősége nem ismert, tehát VUS variánsok, míg az azonosított BRCA2 c.7795G>T variáns ismert, patogén mutáció, mely a fehérje korai terminációját, ezzel funkciójának sérülését okozza. Mindkét mutációtípus esetén van lehetőség a további, mélyebb vizsgálatra.

Amennyiben a daganatban azonosított mutáció ismert, patogén variáns, úgy lehetőségünk van a daganatot részletesebben is megvizsgálni, mely többlet információval szolgálhat, ezzel segítve a személyre szabott daganatterápia sikerességét. Egész szövetszövetblokkok szekvenálásával a daganat genetikai háttérének átlagolt állapotát ismerhetjük meg, azonban ez nem ad pontos képet a tumort felépítő sejtek alpopulációiról, azok megoszlásáról, az esetlegesen már bekövetkezett LOH események arányáról a tumoron belül, illetve a nagy sejtszám vizsgálata elfedhet a tumorban található ritka variánsokat is, amely befolyásolhatja a megfelelő daganatterápia kiválasztását, illetve módosítását.

Dolgozatom első felében egy konkrét daganatos beteg tumorszövet, illetve egészséges szövetmintáinak vizsgálatán keresztül mutattam be egy összehasonlító, a mintákban található sejtszám csökkentésén alapuló módszert<sup>111</sup>. A nagyméretű tumorszövet, illetve a tumortól független, ekto-, valamint mezoderma eredetű egészséges ovárium szövet, vér és szájnyálkahártya minták vizsgálata alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy egy a szakirodalom alapján a BRCA gének esetében ritka, szomatikus mozaicizmus esettel állunk szemben. BRCA gének esetében az ilyen típusú *de novo* mutációk kialakulása ritka, az azonosított esetek többsége heterozigóta genotípusú, körülbelül 50-50%-os allélarányokkal<sup>112-114</sup>. Mivel nem állt módunkban a beteg szüleitől származó szövetminták vizsgálata, az öröklött csíravonal mutáció lehetősége, illetve az embriogenezis korai szakaszában egy ezt követő reverz mutáció, tehát a reverz mozaicizmus jelensége nem zárható ki. Bár a BRCA gének esetében ez nem jellemző<sup>115</sup>. Továbbá megjegyzendő, hogy mivel az egészséges szövetek vizsgálata nem képezi a molekuláris diagnosztika részét, így a fent említett események gyakoriságát csak a jelenlegi ismereteinkre alapozhatjuk, a valóságban ennél sokkal gyakoribb jelenségek is lehetnek.

Eredményeink alapján, a reverz mozaicizmus lehetőségét nem teljesen kizárva, de a lehetséges események valószínűségét szem előtt tartva, arra a következtetésre jutottunk, hogy az egészséges szövetekben 20-25%-os mutációt jelentő T allél frekvencia úgy alakulhatott ki, hogy a mutáció az embriogenezis 2 sejtes állapotában, *de novo* jelent meg (15. ábra). Így kialakítva az egészséges szövettípusokban azonosítható körülbelül 1/4-es mutációt jelentő T allél arányt.



15. ábra: A BRCA2 c.7795G>T patogén variáns feltételezett megjelenése a beteg korai embrionális fejlődése során, melynek eredménye egy ritka, szomatikus mozaicizmus eset, 20-25%-os mutáns allél reprezentáltsággal. Mindez a mutáció kétsejtes állapotban történő megjelenésével magyarázható.

Ennek a ritka esetnek a mélyebb, egyedi sejtek és 5-10 sejtés klaszterek vizsgálatán keresztül mutattuk be magát a módszert, amely a hatékonyabb daganatterápiához szükséges többlet információval szolgálhat. Ehhez az adott szövetmintából lézer disszekciós mikroszkóp segítségével izoláltuk, majd katapultáltuk a vizsgálni kívánt sejtet, illetve sejteket. Ezzel a módszerrel lehetőségünk volt 5-10 sejt szintjén LOH eseményeket azonosítani, illetve az egészséges, független szövettípusokban is kimutattuk a BRCA2 mutáció jelenlétét. Az egyedi sejtek vizsgálata és a szekvenálás eredményeül kapott, adott esetben torzult allélarány felhívja a figyelmet a módszer hátrányára. Kis mintaméret esetén fennáll az allél kilökődés veszélye, mely nagymértékben módosíthatja a végeredményt, így az egyedi sejtek, illetve sejtklaszterek vizsgálata esetén még nagyobb körültekintés szükséges, illetve a megfelelő típusú és mennyiségű kontroll alkalmazása, mellyel az allél drop out jelensége kiküszöbölhető. Mintáink amplifikálhatóságának és szekvenálhatóságának vizsgálatából kiderül, hogy a limitáló lépés a vizsgálni kívánt genomi régió PCR reakcióban történő feldúsítása volt, ami nem minden esetben működött megfelelően. Azoknál a mintáknál, ahol ez sikeres volt, a szekvenálás 100%-os hatékonysággal működött mindkét szekvenálási módszerrel. Mind a Sanger, mind az újgenerációs szekvenálás alkalmasnak bizonyult a mintáink vizsgálatára, bár mivel az NGS eredményeként az összes read-et láthatjuk, konkrét számadatokkal dolgozhatunk tovább és a nagyon kis arányban jelenlévő alléleket is azonosíthatjuk, míg ez a Sanger szekvenálás esetében történő becslés során pontatlanabb az eredmény. A makro- és mikrodisszekció segítségével kigyűjtött mintákból származó allélarányok összehasonlítása alapján 10-20%-os különbség rajzolódik ki, ami egy tumor alpopulációinak vizsgálata esetén pontosabb genetikai háttér ismeretet jelentene. Mindez a jövőben a személyre szabott, hatékonyabb daganatterápia megválasztásában nyújthat segítséget, amennyiben a módszer legalább annyira rutinná válik, mint amennyire ma az újgenerációs szekvenálás alapú driver mutáció azonosítás az.

Munkánk második részében három BRCA1 VUS variánst vizsgáltunk. Mindhárom variáns a BRCA1 C-terminálisán található BRCT doméneket érinti. A c.4983delA (E1661Dfs\*16) a leolvasási keret eltolódását és korai terminációt eredményez. Eddigi ismereteink alapján az a BRCA1 variáns, amelyből legalább az utolsó 11 aminosav hiányzik, patogén. A másik két variáns misszensz típusú, így ezek esetében pusztán a mutáció típusából és helyzetéből nem következtethetünk azok fehérjefunkcióra gyakorolt hatására. A VUS variánsokat bioinformatikai analízisnek vetettük alá, azokat párhuzamosan több szoftverrel vizsgáltuk meg. A predikciók alapján a frameshift variáns,



illetve egy misszensz mutáció (c.5096G>T, R1699L) prediktáltan patogén, míg egy misszensz variáns (c.5410G>A, V1804I) prediktáltan benignus típusú. Annak érdekében, hogy megbizonyosodhassunk a predikció megbízhatóságáról, egy általunk választott, a szakirodalomban fellelhető és VUS variánsok funkcionális vizsgálatához gyakran alkalmazott funkcionális kísérletben is megvizsgáltuk a variánsokat. Az élesztő kis kolónia fenotípus módszer (SCPA) alapját az adja, hogy a vad típusú humán BRCA1 fehérje kifejeződése élesztő sejtekben azok növekedését gátolja, a normálnál kisebb kolóniaméretet eredményezve. Ám abban az esetben, ha a BRCT domén a funkció módosulását eredményező mutációt hordoz, mindez nem tapasztalható és normál kolóniaméretet detektálható. A módszer gyors, költséghatékony és egyszerűen kivitelezhető, mindemellett megfelelően érzékeny és specifikus<sup>116</sup>. Kísérletünkben a vad típusú BRCA1 mellett ismert benignus (c.1067A>G), illetve BRCT domént érintő patogén (c.5123C>A, c.5559G>T) variánsokat alkalmaztunk kontrollként. Eredményeink megfeleltek a bioinformatikai predikció eredményeinek, a frameshift variáns (c.4983delA) és a prediktáltan patogén misszensz mutáció (c.5096G>T) szignifikánsan nagyobb kolóniaméretet eredményezett, mint a vad típusú BRCA1, illetve az ismert benignus BRCA1 variáns. A másik misszensz variáns (c.5410G>A), mely a predikció alapján benignus mutáció, kísérletünkben ezzel egybehangzó eredményt adott, közel a vad típussal azonos kolóniaméretet eredményezett. Jelenleg több, humán sejttenyészet alapú kísérlet beállítása van folyamatban csoportunkban annak érdekében, hogy a VUS variánsok működését illetően még pontosabb eredményt mutathassunk be.

Mivel a VUS variánsok további vizsgálatának célja végső soron a klinikai menedzsment támogatása, így a vizsgált VUS variánsokkal kapcsolatban az alábbi következtetést vontuk le: a predikciós szoftverek és a funkcionális vizsgálat alapján is benignusnak besorolt c.5410G>A variáns passenger mutáció lehet, mely érdemben nem befolyásolja sem a tumorigenezis folyamatát, sem a daganat kezelési lehetőségeit. A két, bioinformatikai és funkcionális analízis alapján is prediktáltan patogén variáns, a c.4983delA és a c.5096G>T lehetnek driverei a daganat kialakulásának, azok vizsgálataink alapján hatással vannak a fehérjefunkcióra, így végső soron a sejtműködésre is. Mivel mindkét variáns a BRCT domént érinti, a fehérje azon régióját, mely többek között a homológ rekombinációs hibajavításhoz is szükséges, így ezek a variánsok valószínűleg deficiensek erre a funkcióra nézve. Ezek alapján lehetséges célzott terápiás lehetőség a PARP inhibitorok alkalmazása. A PARPi kezelés mellett BRCA deficiens daganatok esetén gyakran alkalmaznak platina alapú szereket is, melyek DNS keresztkötéseket

hoznak létre, ezzel pedig a DNS különböző típusú sérüléseit idézik elő <sup>117</sup>. Mivel a BRCA1/2 alapú daganatokra jellemző a kromoszóma instabilitás, amely kromoszóma átrendeződéseket eredményez, nagyobb a valószínűsége daganat-specifikus antigének megjelenésének <sup>118</sup>. Preklinikai tanulmányok számolnak be a BRCA1/2 alapú daganatok megnövekedett szintű antigenicitásáról, valamint arról, hogy ennek a tulajdonságnak köszönhetően az immun-ellenőrzőpont inhibitorok alkalmazása ígéretes kezelési módszernek tűnik <sup>119</sup>. Bár Samstein és munkatársai vizsgálata alapján a BRCA2 alapú daganatok jobban reagálnak az immun-ellenőrzőpontok blokkolására, mint a BRCA1 alapúak, ez valószínűleg a két fehérje hiányában megjelenő mutációk típusával magyarázható. A BRCA2 alapú tumorokra nagy mennyiségű deléció megjelenése jellemző, amelyet valószínűleg az immunrendszer nagyobb hatékonysággal azonosít, mint a BRCA1 hiányában vegyes típusú mutációk jelenléte <sup>120</sup>.

Összegezve, kísérleteinkben olyan módszereket mutattunk be, melyek további segítséget nyújthatnak mind a már kialakult daganatok hatékony kezelésében a vizsgált daganat genetikai hátterének mélyebb, alpopuláció vagy egyedi sejt szintű megismerése útján, mind pedig az egészséges, de ismeretlen klinikai szignifikanciájú BRCA1 variánst hordozó páciensek számára megfelelő klinikai menedzsmentben, amely lehetőséget ad az érintettek megfelelő tájékoztatására, illetve az időben történő esetleges prevenciós lépésekre. Mindez pedig a jövőbeni emlő és petefészek daganatok és az ehhez kapcsolódó halálesetek számának csökkentéséhez járulhat hozzá.

## 8. Magyar nyelvű összefoglaló

A daganatos megbetegedések világszerte a vezető halálokok közé tartoznak. A rákos elváltozások genetikai eredetű betegségek, amelyeket az ezekre hajlamosító gének bizonyos mutáció okoznak. Ezeknek a mutációknak a felhalmozódása malignáns transzformációhoz és a tumorsejtek klonális expanziójához vezet. A daganatos elváltozásokat gyakran hasonlítják a darwini evolúcióhoz, mivel bizonyos génekben a bekövetkező változások, mint például az onkogének aktiváló, vagy a tumorszupresszorok inaktiváló mutációi, szelektív előnyt biztosítanak a tumorsejt számára. Daganatonként átlagosan 2-8 driver mutáció azonosítható, tehát olyan genetikai változás, amely szelektív előnyt jelent a sejt számára. Ezek a mutációk lehetnek csíravonal eredetűek, amelyek tovább öröklődhetnek generációról generációra, de spontán, szomatikus sejtekben, *de novo* is megjelenhetnek. A tumorokban jelenlévő driver mutációk azonosítása rendkívül fontos a hatékony, személyre szabott terápia szempontjából. A BRCA tumorszupresszor gének kulcs szerepet töltenek be a genom integritásának fenntartásában, így az ezekben a génekben megjelenő mutációk komoly következményekkel járhatnak, kiemelt szerepet játszanak az emlő és petefészek daganatok kialakulásában.

DNS-ünkben nap, mint nap keletkeznek sérülések az azt érő külső, illetve belső károsító ágensek hatására. Az ezekkel szembeni védelem és a genom stabilitásának megőrzése érdekében alakult ki egy komplex jelátviteli útvonal hálózat (DDR), amely képes a hiba azonosítására, javítására, illetve szükséges esetben a sejtciklus megakasztására, vagy akár a sejt elpusztítására is. A különböző típusú hibák javításáért más-más hibajavító útvonal, vagy független hibajavító fehérje felelős. A legalapvetőbb DNS sérülések egyike és egyben az egyik legveszélyesebb is a DNS kettősszálú törése (DSB), mivel ebben az esetben nem alkalmazható a komplementer szál a javítás templátjául. Két fő mechanizmus felelős a DSB-k helyreállításáért, a hibamentes, S/G2 fázisokhoz kötött és templát DNS-függő homológ rekombináció és a hibahagyó, a sejtciklus egészében működő és templát DNS-t nem igénylő nem homológ végek összeillesztése (NHEJ).

A BRCA1 és BRCA2 fehérjék részesei a sejt DNS sérülésre adott válaszában (DDR) több, kulcsfontosságú folyamaton keresztül. Mindkét fehérje részt vesz a DNS kettősszálú törésének javításában, elsősorban a hibamentes, homológ rekombinációs hibajavításon keresztül. Több fehérjekomplex részét képezik a homológ rekombináció folyamatában, a BRCA1 a C-terminálisán található BRCT doménjein keresztül, míg a

BRCA2 az N-terminálisán keresztül a PALB2 interakció és a centrális régiójában található BRC ismétlődések Rad51-gyel történő interakciója útján. A BRCA1 a DNS kettősszalú törésének NHEJ útvonalában is szerepet játszik. Ezen felül szerepük van a replikációhoz kapcsolt hibajavításban, a sejtciklus ellenőrzőpontok, valamint a transzkripció szabályozásában is. A BRCA fehérjék nélkülözhetetlenek a sejt megfelelő működése szempontjából, teljes hiányuk az embrionális fejlődés korai szakaszában az embrió pusztulásához vezet.

A BRCA géneket az emlődaganatok kialakulásával kapcsolatban fedezték fel, nevüket is innen kapták (BREast CANcer), ami napjainkban a leggyakrabban előforduló daganattípus és a vezető daganatos halálok nők körében. A BRCA gének patogén csíravonal mutációi felelősek legnagyobb részt (körülbelül 30%) a HBOCS (öröklött emlő és petefészek daganat szindróma) esetekért. A BRCA1/2 génekből hordozott csíravonal mutáció körülbelül 70 %-kal növeli az emlődaganat kialakulásának esélyét 80 éves korig bezárólag. A BRCA mutációt hordozókban kialakuló daganatok sajátos jellemzője a megmaradt vad típusú allél elvesztése (LOH). Mindezt a BRCA gének felépítése tehető felelőssé. Nagy arányban tartalmaznak ismétlődő szekvenciákat, melyek közreműködnek a tumorszupresszor gének genetikai átrendeződéseiben. A BRCA1/2 által irányított tumorevolúciót nem kizárólag öröklött mutáció iniciálhatja, a szomatikus sejtekben, sporadikusan is kialakulhat. Ebben az esetben mindkét BRCA allél a szomatikus sejtekben veszíti el működőképességét.

Mindkét gén esetében számos patogén mutáció ismert, ezek az expresszió elvesztését, illetve a fehérje csonkolódását okozzák javarészt. Egyaránt fellelhető ezek között inszerció, illetve delécio, korai termináció, valamint misszensz mutációk is. Kockázat elemzés szempontjából a misszensz variánsok, illetve az in-frame indelék jelentik a legnagyobb problémát. A BRCA1-gyel kapcsolatban ismert tény, miszerint már az utolsó 11 aminosav elvesztése is patogén variánst eredményez, így a korai terminációval, illetve a leolvasási keret letolódásával járó változásokkal kapcsolatban könnyebb következtetni, míg abban az esetben, ha egyetlen aminosav vagy pozíció változik, nincs egyértelmű válasz. Azokat a variánsokat, melyekről elegendő adat hiányában nem dönthető el egyértelműen, hogy klinikai szempontból kockázatos-e vagy sem, VUS variánsoknak nevezzük.

Munkánk során 4, BRCA gént érintő mutációt azonosítottunk daganatos betegekből származó szövetmintákban. Három BRCA1 VUS variánst és egy a BRCA2 gént érintő patogén variánst. Célunk az volt, hogy bemutassuk, milyen módon és milyen típusú

többlét információt nyerhetünk a különböző mutációtípusok esetén. A VUS variánsok esetén a bioinformatikai eszköztárt vetettük össze egy általunk választott funkcionális kísérlet eredményével, míg az ismert patogén variáns esetén bemutattuk, hogy a vizsgált minta mérete, a mintában jelenlévő sejtszám csökkentése milyen többlét információval szolgálhat a jövőben, hogyan segítheti a még hatékonyabb személyre szabott daganatterápiát.

A petefészek daganatos beteg BRCA2 7795-ös nukleotid pozíciójában azonosított G>T tranzíció ismert, patogén variáns. Először a betegből származó tumor és egészséges ovárium szövetblokk, teljes vér, illetve szájnyalkahártya kenet mintákat vizsgáltuk párhuzamosan Sanger és újgenerációs szekvenálás segítségével. A tumorszövet blokkban mindkét szekvenálási módszer alapján körülbelül 75%-ban volt jelen a mutációt jelentő T allél a vizsgált pozícióban. A betegtől származó, a tumortól független, ekto- és mezoderma eredetű egészséges szövetminták vizsgálata során körülbelül 20-25%-os T allél jelenlétet detektáltunk mind Sanger, mind pedig újgenerációs szekvenálás segítségével. Mindebből arra következtettünk, hogy nem szokványos sporadikus esetről van szó, úgy az egészséges szövetekben nem lenne jelen a G>T tranzíció, viszont valószínűleg nem is öröklött a mutáció, hiszen abban az esetben heterozigóta állapotot, tehát 50-50%-os arányt detektáltunk volna. Így következtettünk arra, hogy egy mozaicizmus esetről van szó, tehát valamikor a korai embriogenezis során jelenhetett meg spontán módon a mutáció, így kialakítva egy mozaikos mintázatot az egyedfejlődés során. Munkánkban ezt a konkrét esetet vizsgáltuk meg mélyebben, egyedi sejteken és 5-10 sejtés klasztereken, párhuzamosan Sanger és újgenerációs szekvenálással, bemutatva, hogy a módszer maga milyen többlét információt adhat a kizárólag nagy sejtszámot tartalmazó minták vizsgálatával szemben. Az egyedi sejtek vizsgálata során ahogy vártuk, azonosítottunk heterozigóta és vad típusú sejteket az egészséges ováriumszövet mintákban, illetve a daganatból származó sejtek esetében számos mintában sikerült kimutatni a heterozigóta állapot elvesztésének jelenségét (LOH). Összességében mindkét szekvenálási módszer közel azonos G/T arány kimutatására volt képes, bár Sanger szekvenálás esetén a szekvenogram csúcsainak arányát csupán becsültük. A mintatípusok szekvenálhatósága és amplifikálhatósága alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a limitáló lépés a PCR amplifikáció, amennyiben sikerült feldúsítani a vizsgálni kívánt BRCA2 genomi régiót, úgy a szekvenálás során már nem ütköztünk problémába. A különböző mintákból származó allél arányok összevetése alapján látszik, hogy 10-20%-os eltérés van a nagy sejtszámot tartalmazó minták és az egyedi sejtek, illetve

sejtklaszterek között. Mindez összességében arra világít rá, hogy a vizsgált minta méretének csökkentése egy daganat vizsgálata során többlet információval szolgálhat. A kis számú sejt egyedi vizsgálata pontosabb képet adhat a tumor összetételéről, az allél arányokról. Így lehetőség nyílik a ritka variánsok azonosítására is egy tumoron belül, valamint a tumort alkotó sejt alpopulációk arányának vizsgálatára, mindez hozzájárulhat a jövőben a még hatékonyabb személyre szabott daganatterápia megválasztásához.

Munkánk második felében a három BRCA1 VUS variáns fehérjeműködésre gyakorolt hatását vizsgáltuk meg predikciós szoftverek, illetve funkcionális kísérletek segítségével. A variánsokat párhuzamosan több bioinformatikai szoftverrel vizsgáltuk, minden esetben két prediktáltan patogén (c.4983delA, c.5096G>T) és egy prediktáltan benignus (c.5410G>A) variáns volt az eredmény. A variánsok funkcionális vizsgálatához egy régóta alkalmazott, megfelelő mértékben érzékeny és specifikus, élesztő alapú kísérletet választottunk. Alapját az adja, hogy a vad típusú BRCA1 fehérje termeltetése élesztőben a kolóniák növekedését akadályozza, ezzel kis kolóniaméretet eredményezve. Mindez a C-terminális elhelyezkedő BRCT domének intaktságának függvénye, amennyiben ezek a domének sérülnek, úgy ez a fenotípus nem látható, az eredmény normál méretű élesztő kolónia. Kísérletünkben kontrollként a vad típusú BRCA1 fehérje mellett bizonyítottan benignus és patogén variánsokat alkalmaztunk, a VUS variánsok expressziójának kolóniaméretre gyakorolt hatását ezekkel vetettük össze. A bioinformatikai predikcióval egybehangzó eredményt kaptunk, vagyis a c.4983delA frameshift variáns és a c.5096G>T misszensz variáns normál kolóniaméretet eredményezett, tehát a mutáció hatására a fehérje BRCT doménje sérül, míg a c.5410G>A variáns esetében a vad típushoz hasonlóan kis méretű kolóniákat kaptunk. Mindez arra enged következtetni, hogy ez a misszensz mutáció nincs hatással a BRCT domén intaktségára, funkciója nem sérül.

Összegezve, munkánk során olyan módszereket mutattunk be, amelyek segítségével konkrét daganatos megbetegedés esetén mélyebb betekintést nyerhetünk a daganat genetikai hátterébe. Jelen dolgozatban egy patogén BRCA2 variánst hordozó, petefészek daganatos beteg tumor és egészséges szövetmintáinak vizsgálatán keresztül szemléltettük, hogy a vizsgált minták méretének csökkentése milyen előnyökkel járhat, adott esetben egy daganat karakterizálása során, a megfelelő tumorterápia megválasztását segítve. Továbbá bemutattuk, hogy ismeretlen klinikai szignifikanciájú BRCA1 variánsokkal kapcsolatban hogyan lehetséges viszonylag gyorsan, költséghatékonyan a

variáns fehérjeműködésre gyakorolt hatását vizsgálni bioinformatikai és funkcionális analízis segítségével.

## 9. Summary of the thesis

Cancerous diseases are among the leading causes of death worldwide. Cancer is a genetic disease caused by certain mutations in cancer susceptibility genes. The accumulation of these mutations leads to malignant transformation and the clonal expansion of tumor cells. Cancerous diseases are frequently compared to Darwinian evolution, as changes in certain genes, for example, activating mutations of oncogenes or inactivating mutations of tumor suppressor genes render selective advantage to the carrier cell. On average, 2-8 driver mutations-mutations that provide selective advantage to cancer cells-can be identified in a tumor. These mutations can be of germline origin, inherited from generation to generation, or they can arise spontaneously, *de novo*, in the somatic cells. The identification of the driver genes of a certain tumor is of great importance for effective, personalized therapy. The *BRCA* genes play a key role in the maintenance of genome integrity; therefore, mutations in these tumor suppressor genes can have serious consequences, and they have a significant role in the emergence of breast and ovarian cancer.

Damage to our DNA occurs constantly, caused by extrinsic or intrinsic factors. To protect against these agents and to maintain genome stability, a complex signaling pathway, the so-called DNA damage response (DDR) network developed. DDR is able to identify the damage, repair it, if necessary, arrest the cell cycle, and even destroy the cell. Various repair pathways and independent repair proteins are responsible for the repair of distinct types of DNA damage. One of the most common and most dangerous DNA damage is DNA double-strand break (DSB), since in this case, there is no intact complementary strand to be used as template for the repair process. Two main mechanisms are responsible for the repair of DSBs: the error-free, S/G2-bound, and template DNA- dependent homologous recombination (HR) and the nonhomologous end-joining (NHEJ), which is error-prone and operates through the whole cell cycle without the requirement of template DNA.

The *BRCA1/2* proteins are involved in DDR via several key processes. Both proteins take part in the repair of DSBs, mainly as players of the error-free HR. These proteins are parts of several protein complexes in the HR process; *BRCA1* through its C-terminally located BRCT domains, while *BRCA2* functions as an interactor for *PALB2* through its N-terminal region and interacts with *Rad51* through centrally located BRC repeats. *BRCA1* also plays a role in DSB repair as part of the NHEJ pathway. Furthermore, both



proteins are involved in replication-coupled repair, in the regulation of cell cycle checkpoints and transcription. BRCA proteins are indispensable for proper cell function; BRCA deficiency leads to embryonic lethality in the early phase of embryonic development.

*BRCA* genes were discovered via their association with the development of breast cancer. Nowadays, breast cancer is the most common type of cancer and the leading cause of death among women. Pathogenic germline mutations of *BRCA* genes are responsible for most of (approximately 30%) the HBOCS (Hereditary Breast and Ovary Cancer Syndrome) cases. Carrying a *BRCA1/2* germline mutation increases the risk of developing breast cancer up to 70% until the age of 80. A unique characteristic of the tumors that develop in *BRCA* mutation carriers is the loss of the wild-type allele (LOH). For this phenomenon, the structure of the *BRCA* genes can be held responsible. These genes contain repetitive sequences at a high ratio, which contribute to the genetic rearrangement of the tumor suppressor genes. *BRCA1/2*-related tumorigenesis cannot only be initiated by inherited mutations but can also occur spontaneously in the somatic cells. In this case, both *BRCA* alleles are inactivated in the somatic cells.

Numerous pathogenic mutations of both tumor suppressor genes are known that mostly lead to the loss of protein expression or result in a truncated protein. Insertions, deletions, early termination, and missense variants can be found among these mutations. From the perspective of risk management, missense and in-frame indels represent the largest problem. It is known that the loss of at least the last 11 amino acids of *BRCA1* results in a pathogenic variant, thus, the effect of changes causing early termination or frameshift is easy to predict. However, in the case of single amino acid changes, the effect is unclear. Those variants whose pathogenicity is uncertain due to lack of information are called variants of uncertain significance (VUS). During our research, we identified four *BRCA* mutations from tumor tissue samples. Three *BRCA1* VUS variants and a pathogenic *BRCA2* variant were found. Our aim was to investigate the types of additional information that can be obtained for the different mutation types. To analyze the *BRCA1* VUS variants, we compared the results of bioinformatics tools and a chosen functional assay. For the known pathogenic *BRCA2* variant, we examined how the refinement of the analysis by downscaling the sample size from tissue to single-cell level can provide additional information for a more effective personalized tumor therapy.

The identified *BRCA2* G>T transition at nucleotide position 7795 in an ovary cancer patient's tissue sample is a known pathogenic variant. First, we examined tumorous and

healthy ovary tissue blocks, whole blood, and buccal mucosal swab of the patient by Sanger and next-generation sequencing in parallel. In the tumor tissue block sample, we found a 75% ratio of the mutant T allele instead of the wild-type G in the examined nucleotide position by both sequencing methods. In the patient's tumor-independent, healthy tissue samples derived from ecto- and mesodermal germ layers, a 20-25% of mutant T allele presence was detected both by Sanger sequencing and NGS. We concluded that this is not a regular sporadic case, since in that event G>T transition would not be detected in the healthy tissues of the patient, but it is not an inherited germline mutation either, as in that case a 50-50% of the G/T alleles should be observed. Our conclusion was that this is a case of somatic mosaicism; the *BRCA2* point mutation occurred spontaneously during the early embryonic development of the patient and formed a mosaic pattern of mutation. We examined this specific case extensively by both Sanger and next-generation sequencing of single cells and clusters of 5-10 cells to determine the type of additional information the method itself can provide in comparison to samples containing high numbers of cells. As presumed, we identified heterozygous and wild-type cells in the healthy ovary tissue samples and detected loss of heterozygosity in several samples derived from the tumor, when analyzing single cells.

In summary, we could detect similar G/T allele ratios with both sequencing methods, although we only estimated the ratio of the Sanger sequencing peaks. Based on amplifiability and sequencability, we concluded that the limiting step of the method is PCR amplification. If the amplification of the *BRCA2* genomic region of interest is successful, the sequencing step does not pose a problem. Comparison of the allele ratio results of the different sample types shows 10-20% disparity between the high-cell-number-containing tissue blocks and the single cells or 5-10-cell-containing cell clusters. This result highlights that decreasing the cell number in the analyzed tumor sample can provide additional information. The investigation of low numbers of cells yields a more precise picture of the composition of the tumor, the allele ratios. This method enables the identification of rare variants and the examination of the ratio of tumor cell subpopulations within the tumor, thus contributing to the selection of a more effective personalized cancer therapy.

Subsequently, we examined the impact of three *BRCA1* VUS variants on protein function via prediction software and a functional assay. The variants were analyzed by several bioinformatics software parallelly, and the results were the same: two were predicted to be pathogenic (c.4983delA, c.5096G>T) and one was predicted to be benign

(c.5410G>A). For the functional analysis of the variants, a long-established, highly sensitive and specific, yeast-based assay was chosen. The assay is based on the fact that the expression of the wild-type human *BRCA1* in yeast cells inhibits the growth of cells, resulting in small colony size. This phenomenon depends on the intactness of the C-terminal BRCT domains: if these domains are damaged, the phenotype cannot be observed; the resulting colonies are of normal size. Besides wild-type *BRCA1*, we used known benign and pathogenic variants as control to compare their results with those of the VUS variants. Our results were consistent with the bioinformatics prediction; the c.4983delA frameshift variant and the c.5096G>T missense variant resulted in normal colony size, which indicates that the mutation causes damage in the BRCT domain, while the c.5410G>A missense variant resulted in small colony size similar to the wild-type, suggesting that this latter missense variant does not affect the intactness of the BRCT domain; its function is not damaged.

In sum, we present methods with which we can gain deeper insight into the genetic background of tumors in specific cancerous diseases. In the present thesis—via an extensive analysis of the ovary tumor and healthy tissues of a pathogenic *BRCA2* variant carrier patient—we demonstrate the benefits of testing smaller samples / a lower number of cells for the characterization of cancerous diseases, enabling a better cancer therapy choice. Furthermore, we present how the effect of a *BRCA1* VUS variant on protein function can be analyzed in a relatively fast and cost-effective manner using bioinformatics and functional assay tools.

## 10. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani csoportunk vezetőjének, **Dr. Haracska Lajosnak** a lehetőségért, hogy a csoport tagjává válhattam, hogy tanulhattam és fejlődhettem.

Hálás vagyok **Dr. Kiss Ernőnek**, témavezetőmnek a sok évnyi tanításért, a rengeteg jó tanácsért és a végtelen türelemért. Hálásan köszönöm a támogatást nem csupán szakmailag, de emberileg is.

Köszönettel tartozom disszertációm bírálóinak, **Dr. Czibula Ágnesnek** és **Dr. Pankotai Tibornak**, amiért elvállalták dolgozatom értékelését.

Köszönöm a segítséget, a jótanácsokat, a közös munkát **Vincze-Kontár Katalinnak**, **Illésné Kovács Katalinnak** és **Nótári Péternének**.

Köszönettel tartozom szakdolgozómnak, **Sánta Ádámnak** a közös munkáért, azért, hogy lehetőséget kaptam a fejlődésre, mint tanár. Köszönöm a csapatmunkát és az együtt töltött időt. Valamint köszönöm neki és **Alexandria Erda Qorrinak** a disszertációmban bemutatott projektben való részvételt.

Köszönök minden segítséget, a közös munkát, a támogatást és a vidám pillanatokat **Dudás Katának** és **Dr. Hegedús Lilinek**.

Köszönöm **Tick Gabriellának** a rengeteg, a munkám során nyújtott segítséget.

Köszönöm **Dr. Enyedi Márton Zsoltnak** és **Pintér Lajosnak**, **Dr. Sükösd Farkasnak** és **Dr. Horváth Péternek** a munkámhoz való hozzájárulásukat, a segítségüket és a jótanácsaikat.

Hálás vagyok a **Mutagenesis és Karcinogenesis Kutatócsoport**, illetve a **DeltaBio2000 Kft.** minden munkatársának a segítségért, a jó tanácsokért és a vidám pillanatokért.

Köszönöm a lehetőséget a **Szegedi Biológiai Kutatóközpontnak** és a **Genetikai Intézetnek**, hogy lehetőséget kaptam az intézményben elvégezni doktori munkámat.

Szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a sok éve töretlenül tartó támogatást, hogy mindig számíthattam rájuk.

A dolgozat elkészítéséhez a **Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal** (PharmaLab, RRF-2.3.1-21-2022-00015- az Európai Unió támogatásával valósult meg- és TKP2021-EGA-09) valamint az **Európai Unió Horizont 2020** kutatási és innovációs program (támogatási megállapodás száma: 739593) nyújtott támogatást.

## 11. Saját közlemények

MTMT azonosító: 10061208

Összesített IF: 21,487

A dolgozat alapját képező közlemény:

Alexandra Gráf\*, Márton Zsolt Enyedi\*, Lajos Pintér, Éva Kriston-Pál, Gábor Jaksa, Árpád Bálint, Éva Ezer, Péter Horváth, Farkas Sükösd, Ernő Kiss, and Lajos Haracska. 2021. „**The Combination of Single-Cell and next-Generation Sequencing Can Reveal Mosaicism for Brca2 Mutations and the Fine Molecular Details of Tumorigenesis.**” *Cancers* 2021, 13, 2354. <https://doi.org/10.3390/cancers13102354> MTMT: 32058695, Impakt faktor: 6,126

\*Megosztott elsőszervezők

További közlemények:

Zsolt Farkas, Luca Fancsalszky, Éva Saskői, Alexandra Gráf, Krisztián Tárnok, Anil Mehta and Krisztina Takács-Vellai. 2018. „**The dosage-dependent effect exerted by the NM23-H1/H2 homolog NDK-1 on distal tip cell migration in *C. elegans*.**” *Laboratory Investigations* 2018, 98, 182–189. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.99> MTMT: 3343343, Impakt faktor: 3,684

Róbert Tóth, Dávid Balogh, Lajos Pintér, Gábor Jaksa, Bence Széplaki, Alexandra Gráf, Zsuzsanna Gyórfy, Márton Zs Enyedi, Ernő Kiss, Lajos Haracska, and Ildikó Unk. „**The Rad5 Helicase and RING Domains Contribute to Genome Stability through Their Independent Catalytic Activities.**” *Journal of Molecular Biology* 2022. 434(5):167437. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167437> MTMT: 32606165, Impakt faktor: 5,469

Erda Qorri, Bertalan Takács, Alexandra Gráf, Márton Zsolt Enyedi, Lajos Pintér, Ernő Kiss, and Lajos Haracska. „**A Comprehensive Evaluation of the Performance of Prediction Algorithms on Clinically Relevant Missense Variants.**” *International Journal of Molecular Sciences* 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23147946> MTMT: 33029933, Impakt faktor: 6,208

Publikáció alatt álló közlemények:

Gaurav Sharma, Gabriel Fenteany, Alexandra Gráf, Ádám Sánta, Lili Hegedűs, Kata Dudás, Mórocz Mónika, Ernő Kiss, Lajos Haracska: **A tetrazole derivative that inhibits Rad6 function, the Rad6–Rad18 interaction and PCNA ubiquitination hinders post-replicative DNA repair**

Qiuzhen Li, Mónika Mórocz, Szilvia Juhász, Lili Hegedűs, Alexandra Gráf, Ádám Sánta, Gaurav Sharma, Péter Burkovics, Ernő Kiss, Lajos Haracska: **FAN1 and Pol eta constitute a pathway for replicational bypass of DNA interstrand crosslinks under the control of RAD18-dependent PCNA-ubiquitylation**

Gabriel Fenteany, Gaurav Sharma, Mónika Mórocz, Ernő Kiss, Alexandra Gráf, Ádám Sánta, Lajos Haracska: **Targeting the interaction between Rad6 and Rad18 with a first-in-class Rad18-binding small molecule blocks the replicational bypass of DNA damage**

## 12. Irodalomjegyzék

1. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. 2021;127(16):3029-3030. doi:10.1002/cncr.33587
2. Nowell P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (80- )*. 1976;194:23-28.
3. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004;10(8):789-799. doi:10.1038/nm1087
4. Errol C. Friedberg. DNA damage and Repair. *Nature*. 2003;421:436-440.
5. Bert Vogelstein, Nickolas Papadopoulos, Victor E. Velculescu, Shibin Zhou, Luis A. Diaz Jr., Kenneth Kinzler. Human genome landscapes. *Science (80- )*. 2013;339:1546-1558. doi:10.1126/science.233.4770.1246-b
6. Welch PL, Owens KN, King M-C. Insight into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet*. 2000;16(2):69-74.
7. Albertsen H, Plaetke R, Ballard L, et al. Genetic mapping of the BRCA1 region on chromosome 17q21. *Am J Hum Genet*. 1994;54(3):516-525.
8. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet*. 1996;14(4):430-440. doi:10.1038/ng1296-430
9. Wu W, Koike A, Takeshita T, Ohta T. The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Div*. 2008;3:1-10. doi:10.1186/1747-1028-3-1
10. Nishikawa H, Ooka S, Sato K, et al. Mass Spectrometric and Mutational Analyses Reveal Lys-6-linked Polyubiquitin Chains Catalyzed by BRCA1-BARD1 Ubiquitin Ligase. *J Biol Chem*. 2004;279(6):3916-3924. doi:10.1074/jbc.M308540200
11. Fabbro M, Rodriguez JA, Baer R, Henderson BR. BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21315-21324. doi:10.1074/jbc.M200769200
12. Rodriguez M, Yu X, Chen J, Songyang Z. Phosphopeptide Binding Specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) Domains. *J Biol Chem*. 2003;278(52):52914-52918. doi:10.1074/jbc.C300407200
13. Zhang F, Fan Q, Ren K, Andreassen PR. PALB2 Functionally Connects the Breast

- Cancer Susceptibility Proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res.* 2009;7(7):1110-1118. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0123.PALB2
14. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 1995;378:789-791.
  15. Chatterjee G, Jimenez-sainz J, Presti T, Nguyen T, Jensen B. Distinct binding of BRCA2 BRC repeats to RAD51 generates differential DNA damage sensitivity. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(11):5256-5270. doi:10.1093/nar/gkw242
  16. Yang H, Li Q, Fan J, Holloman WK. The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA – ssDNA junction. *Nature.* 2005;2(2 mM):653-657. doi:10.1038/nature03215.1.
  17. Yano KI, Morotomi K, Saito H, Kato M, Matsuo F, Miki Y. Nuclear localization signals of the BRCA2 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270(1):171-175. doi:10.1006/bbrc.2000.2392
  18. Pilié PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(2):81-104. doi:10.1038/s41571-018-0114-z
  19. Hoeijmakers JHJ. The consequences of DNA injury Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001;411(6835):366-374.
  20. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 1998;17(18):5497-5508. doi:10.1093/emboj/17.18.5497
  21. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(1):68-78. doi:10.1038/nrc3181
  22. Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, et al. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science (80- ).* 2007;316(5828):1194-1198. doi:10.1126/science.1139476
  23. Feng L, Li N, Li Y, et al. Cell cycle-dependent inhibition of 53BP1 signaling by BRCA1. *Cell Discov.* 2015;1:1-11. doi:10.1038/celldisc.2015.19
  24. Sartori AA, Lukas C, Coates J, et al. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature.* 2007;450(7169):509-514. doi:10.1038/nature06337
  25. Zhang F, Ma J, Wu J, et al. PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response. *Curr Biol.* 2009;524-529. doi:10.1016/j.cub.2009.02.018.



## PALB2

26. O'Donovan PJ, Livingston DM. BRCA1 and BRCA2: Breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*. 2010;31(6):961-967. doi:10.1093/carcin/bgq069
27. West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(6):435-445. doi:10.1038/nrm1127
28. Renodon-Cornié A, Weigel P, Breton M Le, Fleury F. New Potential Therapeutic Approaches by Targeting Rad51-Dependent Homologous Recombination. *Intech*. 2013.
29. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)*. 2008;7(10):1765-1771. doi:10.1016/j.dnarep.2008.06.018
30. Lieber MR. The mechanism of Double -Strand Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. *Annu Rev Biochem*. 2011;79(3):181-211. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131
31. Andreassen PR, Ren K. Fanconi Anemia Proteins, DNA Interstrand Crosslink Repair Pathways, and Cancer Therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009:101-117.
32. Gupta R, Sharma S, Sommers JA, Kenny MK, Cantor SB, Brosh RM. FANCD1 (BACH1) helicase forms DNA damage inducible foci with replication protein a and interacts physically and functionally with the single-stranded DNA-binding protein. *Hematopoesis*. 2007;110(7):2390-2398. doi:10.1182/blood-2006-11-057273
33. Kim H, Chen J, Yu X. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science (80- )*. 2007;316(5828):1202-1205. doi:10.1126/science.1139621
34. Yu X, Chen J. DNA Damage-Induced Cell Cycle Checkpoint Control Requires CtIP, a Phosphorylation-Dependent Binding Partner of BRCA1 C-Terminal Domains. *Mol Cell Biol*. 2004;24(21):9478-9486. doi:10.1128/mcb.24.21.9478-9486.2004
35. Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet*. 2002;30(3):285-289. doi:10.1038/ng837
36. Xu B, Kim S, Kastan MB. Involvement of Brcal in S-Phase and G 2 -Phase Checkpoints after Ionizing Irradiation . *Mol Cell Biol*. 2001;21(10):3445-3450.

doi:10.1128/mcb.21.10.3445-3450.2001

37. Greenberg RA, Sobhian B, Pathania S, Cantor SB, Nakatani Y, Livingston DM. Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev.* 2006;20(1):34-46. doi:10.1101/gad.1381306
38. Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev.* 1997;11(24):3471-3481. doi:10.1101/gad.11.24.3471
39. Stewart GS, Wang B, Bigneli CR, Taylor AMR, Elledge SJ. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature.* 2003;421(6926):961-966. doi:10.1038/nature01446
40. Marmorstein LY, Kinev A V, Chan GKT, et al. A Human BRCA2 Complex Containing a Structural DNA Binding Component Influences Cell Cycle Progression. 2001;104:247-257.
41. Vidarsson H, Mikaelssdottir EK, Rafnar T, et al. BRCA1 and BRCA2 bind Stat5a and suppress its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 2002;532:247-252.
42. Nadeau G, Boufaied N, Moisan A, et al. BRCA1 can stimulate gene transcription by a unique mechanism. *EMBO Rep.* 2000;1(3):260-265.
43. Marmorstein LY, Ouchi T, Aronson STAA. The BRCA 2 gene product functionally interacts with p53 and Rad51. *Med Sci.* 1998;95(November):13869-13874. doi:10.1073/pnas.95.23.13869
44. Welch PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet.* 2001;10(7):705-713. doi:10.1093/hmg/10.7.705
45. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, et al. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res.* 1996;6(11):1029-1049. doi:10.1101/gr.6.11.1029
46. Schubert EL, Lee MK, Mefford HC, et al. BRCA2 in american families with four or more cases of breast or ovarian cancer: Recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. *Am J Hum Genet.* 1997;60(5):1031-1040.
47. Unger MA, Nathanson KL, Calzone K, et al. Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing. *Am J Hum Genet.* 2000;67(4):841-850. doi:10.1086/303076

48. Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, Sulik KK, Koller BH. Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet.* 1996;12(2):191-194. doi:10.1038/ng0296-191
49. Sedic M, Kuperwasser C. BRCA1-haploinsufficiency: Unraveling the molecular and cellular basis for tissue-specific cancer. *Cell Cycle.* 2016;15(5):621-627. doi:10.1080/15384101.2016.1141841
50. Cavalli LR, Singh B, Isaacs C, Dickson RB, Haddad BR. Loss of heterozygosity in normal breast epithelial tissue and benign breast lesions in BRCA1/2 carriers with breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;149(1):38-43. doi:10.1016/S0165-4608(03)00282-6
51. Yoshida R. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast Cancer.* 2021;28(6):1167-1180. doi:10.1007/s12282-020-01148-2
52. Kleibl Z, Kristensen VN. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *Breast.* 2016;28:136-144. doi:10.1016/j.breast.2016.05.006
53. Li ML, Greenberg RA. Links between genome integrity and BRCA1 tumor suppression. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(10):418-424. doi:10.1016/j.tibs.2012.06.007
54. Venkitaraman AR. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science (80- ).* 2014;343(6178):1470-1475. doi:10.1126/science.1252230
55. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(2):110-120. doi:10.1038/nrc.2015.21
56. Staff S, Isola J, Tanner M. Haplo-insufficiency of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* 2003;63(16):4978-4983.
57. Thompson D, Easton DF. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(18):1358-1365. doi:10.1093/jnci/94.18.1358
58. Easton D. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers: The breast cancer linkage consortium. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(15):1310-1316. doi:10.1093/jnci/91.15.1310
59. Li S, Silvestri V, Leslie G, et al. Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants . *J Clin Oncol.* 2022:14-17. doi:10.1200/jco.21.02112

60. Boardman LA, Thibodeau SN, Schaid DJ, et al. Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann Intern Med.* 1998;128(11):896-899. doi:10.7326/0003-4819-128-11-199806010-00004
61. Lynch ED, Ostermeyer EA, Lee MK, et al. Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, Cowden disease, and juvenile polyposis. *Am J Hum Genet.* 1997;61(6):1254-1260. doi:10.1086/301639
62. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science (80- ).* 1990;250(4985):1233-1238. doi:10.1126/science.1978757
63. Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene.* 2006;25(43):5906-5911. doi:10.1038/sj.onc.1209873
64. Meijers-Heijboer H, Van den Ouweland A, Klijn J, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2\*1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations: The CHEK2-breast cancer consortium. *Nat Genet.* 2002;31(1):55-59. doi:10.1038/ng879
65. Thomas PS, Brown PH. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *Breast Dis.* 2015;26(3):206-208. doi:10.1016/j.breastdis.2015.07.017
66. Kolinjivadi AM, Sannino V, de Antoni A, Técher H, Baldi G, Costanzo V. Moonlighting at replication forks – a new life for homologous recombination proteins BRCA1, BRCA2 and RAD51. *FEBS Lett.* 2017;591(8):1083-1100. doi:10.1002/1873-3468.12556
67. Suszynska M, Kluzniak W, Wokolorczyk D, et al. Bard1 is a low/moderate breast cancer risk gene: Evidence based on an association study of the central european p.q564x recurrent mutation. *Cancers (Basel).* 2019;11(6):1-18. doi:10.3390/cancers11060740
68. Kim J, Kwon J, Kim M, Do J, Lee D, Han H. Low-dielectric-constant polyimide aerogel composite films with low water uptake. *Polym J.* 2016;48(7):829-834. doi:10.1038/pj.2016.37
69. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2017;317(23):2402-2416. doi:10.1001/jama.2017.7112
70. Szabo CI, Worley T, Monteiro ANA. Understanding germ-line mutations in BRCA1. *Cancer Biol Ther.* 2004;3(6):515-520. doi:10.4161/cbt.3.6.841
71. Lindor NM, Goldgar DE, Tavtigian S V., Plon SE, Couch FJ. BRCA1/2 Sequence

- Variants of Uncertain Significance: A Primer for Providers to Assist in Discussions and in Medical Management. *Oncologist*. 2013;18(5):518-524. doi:10.1634/theoncologist.2012-0452
72. Ramus SJ, Kote-Jarai Z, Friedman LS, et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in hungarian families with breast or breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet*. 1997;60(5):1242-1246.
  73. Looij M Van Der, Szabo C, Besznyak I, et al. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary. *Int J Cancer*. 2000;86:737-740. doi:10.1002/ijc.22269
  74. 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.
  75. 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. doi:10.4102/aosis.2021.bk252.05
  76. Wallace AJ. New challenges for BRCA testing: A view from the diagnostic laboratory. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(S1):S10-S18. doi:10.1038/ejhg.2016.94
  77. Dapic V, Monteiro ANA. Functional implications of BRCA1 for early detection, prevention, and treatment of breast cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2006;16(3):233-252. doi:10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v16.i3.30
  78. Johan Vallon-Christersson, Charmagne Cayanan, Karin Haraldsson, et al. Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet*. 2001:353-360.
  79. Monteiro ANA, Avery August, Hidesaburo Hanafusa. Evidence for a Transcriptional Activation Function of BRCA1 C-Terminal Region. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93(24):13595-13599.
  80. Chapman MS, Verma IM. Transcriptional activation by BRCA1. *Nature*. 1996;382(6593):678-679. doi:10.1038/382678a0
  81. Phelan CM, Dapic V, Tice B, et al. Classification of BRCA1 missense variants of unknown clinical significance. *J Med Genet*. 2005;42(2):138-146. doi:10.1136/jmg.2004.024711
  82. Coyne RS, McDonald HB, Edgemon K, Brody LC. Functional characterization of BRCA1 sequence variants using a yeast small colony phenotype assay. *Cancer*

- Biol Ther.* 2004;3(5):453-457. doi:10.4161/cbt.3.5.809
83. Humphrey JS, Salim A, Erdos MR, Collins FS, Brody LC, Klausner RD. Human BRCA1 inhibits growth in yeast: Potential use in diagnostic testing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(11):5820-5825. doi:10.1073/pnas.94.11.5820
  84. Monteiro ANA, Humphrey JS. Yeast-based assays for detection and characterization of mutations in BRCA1. *Breast Dis.* 1998;10(1-2):61-70. doi:10.3233/BD-1998-101-208
  85. Yumay Chen, Andrew A. Farmer, Chi-Fen Chen, Diane C. Jones, Phang-Lang Chen, Wen-Hwa Lee. BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. 1996:3168-3172.
  86. Coene ED, Hollinshead MS, Waeytens AAT, et al. Phosphorylated BRCA1 is predominantly located in the nucleus and mitochondria. *Mol Biol Cell.* 2005;16(2):997-1010. doi:10.1091/mbc.E04-10-0895
  87. Monteiro ANA, Birge RB. A nuclear function for the tumor suppressor BRCA1. *Histol Histopathol.* 2000;15(1):299-307.
  88. Scully R, Ganesan S, Brown M, et al. Location of BRCA1 in human breast and ovarian cancer cells. *Science* (80- ). 1996;272(5258):123-126. doi:10.1126/science.272.5258.123
  89. Au WWY, Henderson BR. The BRCA1 RING and BRCT domains cooperate in targeting BRCA1 to ionizing radiation-induced nuclear foci. *J Biol Chem.* 2005;280(8):6993-7001. doi:10.1074/jbc.M408879200
  90. Feng Z, Kachnic L, Zhang J, Powell SN, Xia F. DNA damage induces p53-dependent BRCA1 nuclear export. *J Biol Chem.* 2004;279(27):28574-28584. doi:10.1074/jbc.M404137200
  91. Rodríguez JA, Henderson BR. Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1. *J Biol Chem.* 2000;275(49):38589-38596. doi:10.1074/jbc.M003851200
  92. Wang H, Yang ES, Jiang J, Newsheem S, Xia F. DNA damage-induced cytotoxicity is dissociated from BRCA1's DNA repair function but is dependent on its cytosolic accumulation. *Cancer Res.* 2010;70(15):6258-6267. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4713
  93. Anantha RW, Simhadri S, Foo TK, et al. Functional and mutational landscapes of BRCA1 for homology-directed repair and therapy resistance. *Elife.* 2017;6:1-21. doi:10.7554/eLife.21350

94. Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasint M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell*. 1999;4(4):511-518. doi:10.1016/S1097-2765(00)80202-6
95. Ransburgh DJR, Chiba N, Ishioka C, Toland AE, Parvin JD. The effect of BRCA1 missense mutations on homology directed recombination. *Cancer Res*. 2011;70(3):988-995. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2850.The
96. Scully R, Ganesan S, Vlasakova K, Chen J, Socolovsky M, Livingston DM. Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol Cell*. 1999;4(6):1093-1099. doi:10.1016/S1097-2765(00)80238-5
97. Giovannini S, Weller MC, Repmann S, Moch H, Jiricny J. Synthetic lethality between BRCA1 deficiency and poly(ADP-ribose) polymerase inhibition is modulated by processing of endogenous oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(17):9132-9143. doi:10.1093/NAR/GKZ624
98. Findlay GM, Daza RM, Martin B, et al. Accurate classification of BRCA1 variants with saturation genome editing. *Nature*. 2018;562(7726):217-222. doi:10.1038/s41586-018-0461-z
99. Liu H, Naismith JH. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol*. 2008;8:91. doi:10.1186/1472-6750-8-91
100. Feliciello I, Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from Escherichia coli. *Anal Biochem*. 1993;212(2):394-401. doi:10.1006/abio.1993.1346
101. Koh CM. *Isolation of Genomic DNA from Mammalian Cells*. Vol 529. 1st ed. Elsevier Inc.; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00013-6
102. Tang H, Thomas PD. PANTHER-PSEP: Predicting disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. *Bioinformatics*. 2016;32(14):2230-2232. doi:10.1093/bioinformatics/btw222
103. López-Ferrando V, Gazzo A, De La Cruz X, Orozco M, Gelpí JL. PMut: A web-based tool for the annotation of pathological variants on proteins, 2017 update. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W222-W228. doi:10.1093/nar/gkx313
104. Capriotti E, Calabrese R, Fariselli P, Martelli PL, Altman RB, Casadio R. WS-SNPs&GO: a web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation. *BMC Genomics*. 2013;14 Suppl 3(Suppl 3). doi:10.1186/1471-2164-14-s3-s6
105. Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, et al. UniProt: the Universal Protein

- knowledgebase. *Nucleic Acid Res.* 2004;32. doi:10.1093/nar/gkh131
106. Lori S. Friedman, Elizabeth A. Ostermeyer, Csilla I. Szabo, et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet.* 1994;8(4):399-404. doi:10.1038/ng1294-340
  107. Roth A, McPherson A, Laks E, et al. Clonal genotype and population structure inference from single-cell tumor sequencing. *Nat Methods.* 2016;13(7):573-576. doi:10.1038/nmeth.3867
  108. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology Sue. *Genet Med.* 2015:405-424. doi:10.1111/aos.13972\_502
  109. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. Mutationtaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11(4):361-362. doi:10.1038/nmeth.2890
  110. Holt JT, Thompson ME, Szabo C, et al. Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. *Nat Genet.* 1996;12(3):298-302. doi:10.1038/ng0396-298
  111. Gráf A, Enyedi MZ, Pintér L, et al. The combination of single-cell and next-generation sequencing can reveal mosaicism for brca2 mutations and the fine molecular details of tumorigenesis. *Cancers (Basel).* 2021;13(10). doi:10.3390/cancers13102354
  112. Kwong A, Ng EKO, Tang EYH, et al. A novel de novo BRCA1 mutation in a Chinese woman with early onset breast cancer. *Fam Cancer.* 2011;10(2):233-237. doi:10.1007/s10689-011-9429-y
  113. Hansen TVO, Bisgaard ML, Jønson L, et al. Novel de novo BRCA2 mutation in a patient with a family history of breast cancer. *BMC Med Genet.* 2008;9:1-7. doi:10.1186/1471-2350-9-58
  114. Edwards E, Yearwood C, Sillibourne J, Baralle D, Eccles D. Identification of a de novo BRCA1 mutation in a woman with early onset bilateral breast cancer. *Fam Cancer.* 2009;8(4):479-482. doi:10.1007/s10689-009-9270-8
  115. Azzollini J, Pesenti C, Ferrari L, et al. Revertant mosaicism for family mutations is not observed in BRCA1/2 phenocopies. *PLoS One.* 2017;12(2):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0171663
  116. Lyra PCM, Nepomuceno TC, de Souza MLM, et al. Integration of functional assay



- data results provides strong evidence for classification of hundreds of BRCA1 variants of uncertain significance. *Genet Med.* 2021;23(2):306-315. doi:10.1038/s41436-020-00991-0
117. Panzarino NJ, Krais JJ, Cong K, et al. Replication gaps underlie BRCA deficiency and therapy response. *Cancer Res.* 2021;81(5):1388-1397. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-1602
  118. Criscitiello C, Curigliano G. Tumour infiltrating lymphocytes and correlation with response to intensified platinum-based chemotherapy in BRCA-like tumours. *Eur J Cancer.* 2020;127:236-239. doi:10.1016/j.ejca.2019.12.004
  119. Nolan E, Savas P, Policheni AN, et al. Combined immune checkpoint blockade as a therapeutic strategy for BRCA1-mutated breast cancer. *Sci Transl Med.* 2017;9(393):1-13. doi:10.1126/scitranslmed.aal4922
  120. Samstein RM, Krishna C, Ma X, et al. Mutations in BRCA1 and BRCA2 differentially affect the tumor microenvironment and response to checkpoint blockade immunotherapy. *Nat Cancer.* 2020;1(12):1188-1203. doi:10.1038/s43018-020-00139-8