



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

Doktori értekezés tézisei

Gráf Alexandra

Témavezetők: Dr. Haracska Lajos

Tudományos tanácsadó

Dr. Kiss Ernő

Tudományos főmunkatárs

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2022.

Bevezetés

Napjainkban a daganatos megbetegedések világszerte a vezető halálokok közé tartoznak. Ezek a betegségek genetikai eredetűek, a DNS állományban bekövetkező változások felelősek a sejtek malignus transzformációjáért, valamint klonális expanziójáért. A tumorevolúciót gyakran hasonlítják a darwini szelekcióhoz, mivel bizonyos genetikai változások, például az onkogének aktiváló, vagy a tumorszupresszorok inaktíváló mutációi szelektív előnyt biztosítanak a sejt számára. A BRCA1 és a BRCA2 (BRCA1/2) gének tumorszupresszor gének, melyek patogén variánsai központi szerepet játszanak az emlő- és/vagy petefészek daganatok kialakulásában.

A BRCA1/2 gének nélkülözhetetlen szerepet játszanak a genom integritásának megőrzésében. Részt vesznek a DNS kettősszálú törésének javításában és a sejtciklus ellenőrzőpontok, valamint a transzkripció szabályozásában is. E gének inaktíváló mutációinak megjelenése a sejtben a mutációk felhalmozódásához vezet, amely újabb lépés a daganatos elváltozás kialakulásához vezető úton.

A BRCA gének által vezetett tumorigenezis lehet öröklött vagy szomatikus. Öröklött tumorigenezis esetén az egyik allélt érintő inaktíváló BRCA mutáció csíravonal eredetű, a másik allél a szomatikus sejtekben, későbbi életszakaszban inaktíválódik. A BRCA gének csíravonal eredetű patogén mutációi felelősek legnagyobb részt az öröklődő emlő- és petefészek-daganat szindrómás (HBOCS) esetekért, mely szindróma drasztikusan

megnövekedett kockázatot jelent a fiatal korban kialakuló emlő- és/vagy petefészek daganatok szempontjából. Sporadikus tumorigenezis esetén mindkét BRCA allél az egyed szomatikus sejtjeiben veszíti el a megfelelő működőképességét.

Napjainkban már elérhető a hatékony, személyre szabott terápia, melyben a rutinszerűen alkalmazott molekuláris diagnosztika nyújt segítséget azzal az elsődleges céllal, hogy a tumor kialakulásához vezető driver mutációkat azonosítsa. A BRCA gének esetén a molekuláris diagnosztika javarészt direkt szekvenáláson alapul, mely a már kialakult daganat genetikai hátterének feltérképezése mellett a potenciálisan csírvonal mutációt hordozó, HBOCS esetek időben történő azonosítását, a hordozó tájékoztatását és a prevenció lehetőségét is szolgálja.

Az azonosított patogén BRCA mutációk nagy része az expresszió elvesztésével, vagy a fehérje csonkolódásával jár. Mindkét gén esetében azonban számos misszensz variáns, valamint in-frame deléció/inszerció is ismert. Kockázatértékelés szempontjából ezek a mutációk jelentik a legnagyobb kihívást, mivel nem lehet következtetni a mutáció fehérjefunkcióra gyakorolt hatására. Klinikai adatok hiányában ezeknek az ismeretlen klinikai szignifikanciájú variánsoknak (VUS) a további, bioinformatikai predikciós és funkcionális kísérlet alapú vizsgálata szükséges.

Célkitűzés

Munkánk során célunk volt betekintést nyújtani olyan módszerekbe, amelyekkel többlet információval szolgálhatunk akár egy már kialakult daganat genetikai hátterével, akár ismeretlen klinikai szignifikanciájú BRCA mutációk hatásával kapcsolatban. Kutatási célunk eléréséhez a következő kísérleti terveket fogalmztuk meg:

- BRCA1/2 mutációk azonosítása daganatos betegek tumorszövet-mintáiból újgenerációs szekvenálás segítségével
- Az azonosított patogén BRCA2 variáns vizsgálata a beteg különböző szövetmintáin Sanger és újgenerációs szekvenálással, szövetblokkoktól az egyedi sejtek szintjéig
- A szekvenálási módszerek és a különböző nagyságú mintákból származó eredmények összevetése
- Az azonosított BRCA1 VUS variánsok vizsgálata bioinformatikai predikciós szoftverek segítségével
- A vizsgált BRCA1 variánsok létrehozása a molekuláris klónozás eszköztárával
- A VUS variánsok vizsgálata kis kolónia fenotípus kísérlet segítségével

Anyagok és módszerek

- Molekuláris klónozás a kis kolónia fenotípus kísérlethez (mutagén PCR, restrikciós emésztés, fragment izolálás agaróz gélből, ligálás, LR klónozás, plazmid tisztítás)
- Agaróz gélelektroforézis
- Bakteriális és élesztőtranszformáció
- Western blot
- BRCA1/2 mutációk azonosítása újgenerációs szekvenálással
- PCR nagy sejtszámot tartalmazó mintákon
- Lézer mikrodisszekció
- PCR 5-10 sejtes klasztereken és egyedi sejteken
- Amplikonok Sanger és újgenerációs szekvenálása
- BRCA1 VUS variánsok predikciós analízise bioinformatikai eszköztárral
- Élesztőkolónia-mérés

Eredmények

A mutációk azonosítása daganatos betegből származó szövetmintákban

A BRCA1/2 mutációkat a teljes kódoló régiók újgenerációs szekvenálásával azonosítottuk, molekuláris diagnosztikai céllal. Az elérhető adatbázisok alapján az azonosított BRCA2 c.7795G>T variáns patogén, korai stop kodont eredményez. A három azonosított BRCA1 variáns: a c.4983delA, a c.5096G>T és a c.5410G>A a ClinVar adatbázis alapján ismeretlen klinikai szignifikanciájú (VUS). Mindhárom mutáció a fehérje BRCT doménjét érinti.

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

Az azonosított patogén BRCA2 mutációt a beteg tumoros és egészséges ováriumszövetének FFPE blokkjaiban, szájnyalkahártyájában, valamint vérmintájában vizsgáltuk, párhuzamosan Sanger és újgenerációs szekvenálással, összehasonlítva a két módszer megbízhatóságát. Az NGS alapján a tumormintákban 77-78%-ban volt jelen a mutációt jelentő T allél a 7795-ös nukleotid pozícióban. A Sanger szekvenálás eredményeül kapott szekvenogram csúcaiból becsült allélarány közel azonos volt. Nem várt módon a beteg egészséges, tumortól független és különböző csíralemez eredetű mintáiban is jelen volt a mutációt jelentő T allél, körülbelül 20-25%-os arányban. Ebből

arra következtettünk, hogy a mutáció nem öröklött, hanem egy szomatikus mozaikos eset.

A BRCA2 c.7795G>T mutáció vizsgálata a beteg tumoros és egészséges szövetmintáinak egyedi sejtjein és 5-10 sejtes klaszterein

A makrodisszekált szövetblokkok vizsgálatának eredménye átlagot képvisel a genetikai hátteret illetően, ezért az egyes mintákban található sejtszámot drasztikusan csökkentettük. Munkánk során egyedi sejteket és 5-10 sejtet tartalmazó klasztereket vizsgáltunk. A minták izolációjához lézer mikrodisszekciót alkalmaztunk, a szakember által kiválasztott sejteket lézerfény segítségével katapult puffer tartalmú mikrocentrifuga csövek kupakjába izoláltuk. Az egészséges ováriumsejtek esetében a vártnak megfelelően vad típusú, illetve heterozigóta sejteket azonosítottunk. Az ebből a szövetből származó klaszter esetében 30%-os T allél arány volt megfigyelhető, míg a tumorszövet-klaszterek esetében 100%-ban a mutációt jelentő T allélt tartalmazó mintát is azonosítottunk, mely a korábban már lezajlott heterozigóta állapot elvesztésére (LOH) utal.

A különböző szövetminta-típusok amplifikálhatósága és szekvenálhatósága

A vizsgált FFPE mintákkal való munka hatékonyságát rontja a formalin fixáció, és az egyedi sejtekhez és klaszterekhez használt lézer mikrodisszekció tovább roncolja azok DNS-

állományát. Egy-egy sejt elvesztése a végeredményre sokkal nagyobb hatással van, mint a szövetblokkok esetén. Eredményeink alapján a limitáló lépés a vizsgálni kívánt genomi régió PCR amplifikációja; amennyiben ez a lépés sikeres, úgy a szekvenálás már nem jelent akadályt.

A szövetblokk és egyedi sejt/sejtklaszter szekvenálás eredményének összehasonlítása

A makro- és mikrodisszekált minták esetében a végleges G/T arányban 10-20%-os eltérés figyelhető meg, tehát a mintában lévő sejtszám csökkentése érdemben módosítja a végeredményt.

Az ismeretlen klinikai szignifikanciájú BRCA1 variánsok vizsgálata bioinformatikai analízis segítségével

Több bioinformatikai predikációs szoftvert alkalmaztunk párhuzamosan annak érdekében, hogy az egyes BRCA1 VUS variánsokat besorolhassuk a valószínűleg benignus, illetve valószínűleg patogén kategóriákba. A bioinformatikai analízis az ACMG/AMP ajánlásának megfelelően került kivitelezésre. A misszensz variánsokhoz használt PANTHER-PSEP, PMut és SNP&GO eltérő algoritmus alapján működő szoftverek. A deléciós mutáció vizsgálatához a MutationTaster2 szoftvert alkalmaztuk. A predikációs szoftverek a vizsgált BRCA1 c.4983delA, c.5096G>T és c.5410G>A variánsok esetében egybehangzó végeredménnyel szolgáltak. Ezek alapján a c.4983delA deléciós mutáns, illetve a c.5096G>T misszensz

variáns predikáltan patogének, míg a c.5410G>A predikáltan benignus.

A BRCA1 VUS variánsok expressziója és a kis kolónia fenotípus vizsgálata

A bioinformatikai predikció megerősítése érdekében egy, a szakirodalom alapján megbízható, gyakran alkalmazott és könnyen kivitelezhető kísérletet végeztünk el, a kis kolónia fenotípus kísérletet. A humán BRCA1 élesztősejtekben történő kifejeződése akadályozza azok növekedését, ezzel kis kolónia fenotípust alakítva ki. Ez a fenotípus a BRCT domének működőképességét érintő variánsok esetében nem azonosítható. Mivel az eredményre hatással lehet az egyes variánsok expressziós szintbeli különbsége, Western blot kísérlettel megbizonyosodtunk róla, hogy a variánsok azonos mértékben fejeződnek ki.

A kísérlet eredménye alapján a vad típus és az ismert benignus variáns csökkent kolónia méretet eredményezett, míg az ismert patogén variánsok normált. A három VUS variáns a bioinformatikai predikció alapján vártak megfelelő eredménnyel szolgált: a c.4983delA és a c.5096G>T variáns expressziója az ismert patogén variánsokhoz hasonlóan normál kolóniaméretet eredményezett, míg a c.5410G>A kis kolónia fenotípust mutatott, mint a vad típusú BRCA1 és az ismert benignus variáns.

Összefoglalás

Napjainkban a daganatos megbetegedések a vezető halálokok közé tartoznak világszerte. A humán BRCA1/2 tumorszupresszorok patogén mutációi főszerepet játszanak az emlő-, illetve a petefészek-daganatok kialakulásában. A rákos megbetegedések kezeléséhez már elérhető a személyre szabott terápia, a molekuláris diagnosztika segítségével.

A BRCA1/2 molekuláris diagnosztika a nagyszámú sejtet tartalmazó tumorszövetblokkok direkt szekvenálásán alapul, és ez átlagolt képet ad a daganat genetikai hátteréről. Az egy mintában vizsgált sejtek számának drasztikus csökkentése pontosabb képet ad a daganat összetételéről, genetikai hátteréről, amit egy BRCA2 patogén mutációt hordozó daganatos beteg tumoros és egészséges szövetmintáinak vizsgálatán keresztül mutatunk be. Eredményeink alapján 10-20%-os különbség van a vizsgált pozíció allélarányaiban a szövetblokk, illetve a kis sejtszámot tartalmazó minták esetén, tehát érdemben változtat a végeredményen a minta mérete.

Ha az azonosított BRCA1/2 mutáció ismeretlen klinikai szignifikanciájú, a hatékony klinikai menedzsment érdekében szükséges a variáns további tanulmányozása, ami bioinformatikai predikciós szoftverekkel és a variánsok funkcionális analízisével lehetséges.

Summary

Nowadays, cancerous diseases are among the leading causes of death worldwide, and pathogenic mutations of the human BRCA1/2 tumour suppressors play a major role in the formation of breast and ovarian cancer. Personalized therapy for the treatment of cancer is enabled by molecular diagnostics.

The molecular diagnostics of BRCA1/2 is based on the direct sequencing of tumour tissue blocks, which contain large numbers of cells, presenting an averaged view of the genetic background. Drastically decreasing the cell number in a sample gives a more precise view of the composition of the tumour and the genetic background, as we demonstrated via the examination of a BRCA2 pathogenic variant carrier's tumorous and healthy tissue samples. Our results show a 10-20% difference between the allele ratios at the monitored nucleotide position between the tissue block and the decreased-cell-number-containing samples; thus, the size of the sample significantly affects the final result.

If the identified BRCA1/2 variant is of unknown clinical significance, effective clinical management requires further examination of the variant employing bioinformatical prediction software and functional assays.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a lehetőséget csoportvezetőmnek, **Dr. Haracska Lajosnak** a csoportban való munkára és fejlődésre.

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Kiss Ernőnek** a sok évnyi támogatást, tanítást és türelmet, valamint a közös munkát.

Köszönettel tartozom **Vincze-Kontár Katalinnak, Illésné Kovács Katalinnak** a támogatásért és a jó tanácsokért.

Köszönöm a közös munkát a bemutatott munka résztvevőinek, kiemelten **Dr. Enyedi Márton Zsoltnak, Pintér Lajosnak, Dr. Sükösd Farkasnak, Dr. Horváth Péternek, Alexandria Erda Qorrinak** és **Sánta Ádámnak**.

Köszönöm a segítséget **Ádámné Tick Gabriellának** a publikációk, pályázatok írása során nyújtott segítséget.

Hálával tartozom a **Mutagenезis és Karcinogenезis Kutatócsoport**, illetve a **DeltaBio 2000 Kft.** minden munkatársának a közös munkáért, a jó tanácsokért.

Köszönöm a **Szegedi Biológiai Kutatóközpontnak**, valamint az **SZBK Genetika Intézetének**, hogy lehetőséget kaptam a doktori képzés teljesítésére.

Köszönöm a támogatást családomnak és barátaimnak.

A dolgozat elkészítéséhez a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (PharmaLab, RRF-2.3.1-21-2022-00015-a projekt 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.

Saját közlemények jegyzéke

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 elsőszerző

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

Nyilatkozat

Alulírott, Dr. Haracska Lajos, nyilatkozom, hogy Gráf Alexandra doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „*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.” közleményben bemutatott hozzájárulását. A doktori értekezésben bemutatott eredményekben, valamint a további közlemények fokozatszerzéshez felhasznált anyagrészeiben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és más doktori fokozatszerzésben nem kerültek és a jövőben sem kerülnek felhasználásra.

Szeged, 2022.08.05.



Dr. Haracska Lajos

Témavezető

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Enyedi Márton Zsolt, nyilatkozom, hogy Gráf Alexandra doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „*Alexandra Gráf**, *Márton Zsolt Enyedi**, *Lajos Pintér*, *Éva Kriston-Pál*, *Gábor Jaksa*, *Árpád Bálind*, *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.” közleményben bemutatott hozzájárulását. A doktori értekezésben bemutatott eredményekben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és más doktori fokozatszerzésben nem kerültek és a jövőben sem kerülnek felhasználásra.

Szeged, 2022.08.05.



Dr. Enyedi Márton Zsolt

Megosztott elsőszerző