**MUDr. Petra Kleiblová, Ph.D.;** Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze & Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN v Praze

**Přínos funkčních a RNA analýz pro klasifikaci zárodečných variant nejasného významu v onkogenetice**

Zhoubné solidní nádory (ZN) jsou po kardiovaskulárních chorobách druhou nejčastější příčinou úmrtí ČR. Většina ZN vzniká sporadicky, ale v ~5-10 % se jedná o nádory dědičné (s prokázanou germinální patogenní variantou; gPV). Spektrum postižených genů a četnost gPV se liší mezi jednotlivými ZN: u ZN ovaria může přesahovat 25 % případů, u ZN prsu a pankreatu dosahuje ~10 % případů a u ZN kolorekta nepřesahuje 4 % případů. Nejčastěji se tak setkáváme s nosiči gPV v genech *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHEK2* a *ATM* v rámci syndromu dědičného karcinomu prsu, ovaria, prostaty a pankreatu a v *MLH1*, *MSH2*/*EPCAM*, *MSH6* a *PMS2* u osob s Lynchovým syndromem (ZN kolorekta, endometria a ovarií).
Testování nádorové predispozice obvykle probíhá na úrovni DNA získané z leukocytů periferní krve s využitím NGS. V rámci genetického testování jsou gPV na základě pravděpodobnosti patogenity klasifikované do pěti tříd. Klinicky významné jsou varianty patogenní (třídy 4 a 5), avšak majoritu nálezů v rámci genetického testování tvoří varianty nejasného významu (VUS; třída 3), jejichž biologický a tudíž i klinický význam je nejasný. Přítomnost VUS komplikuje germinální testování a jejich reklasifikace je jednou ze základních otázek klinického výzkumu v onkogenetice. Mocným nástrojem jsou analýzy RNA ukazující dopad variant na biogenezi mRNA a *in vitro* analýzy hodnotící funkční kapacitu variantních proteinů.
Za účelem objasnit, zda identifikované VUS postihují sestřih mRNA, jsme do vyšetření nádorové predispozice zařadili analýzu RNA. Nejprve cíleně pro vybrané VUS pomocí RT-PCR, od roku 2019 s využitím panelového RNA-NGS, které navíc umožňuje kvantitativní vyšetření přítomných sestřihových variant mRNA. V roce 2023 jsme RNA-NGS analýzy zařadili paralelně k DNA vyšetření u všech indikovaných pacientů (do současnosti takto vyšetřeno >4000 osob). Výsledky RNA-NGS analýz umožnily klasifikovat nové gPV v nádorových predispozičních genech a umožnily přesnější stanovení rizik vzniku dědičných forem ZN prsu, ovaria, melanomu, nebo lymfomů.
Typické gPV mají charakter nonsense, sestřihových nebo posunových mutací či rozsáhlých strukturních přestaveb vedoucích ke ztrátě části/celého proteinu. Méně často je známým inaktivačním mechanizmem záměna aminokyseliny (missense varianty), které však tvoří největší podíl z VUS. V naší práci jsme se zaměřili na VUS varianty v genu *CHEK2*, jehož gPV jsou u ZN prsu spojeny se středním rizikem, avšak společně s gPV v *BRCA1* a *BRCA2* jsou v Evropské populaci nejčastější. Ve spolupráci s MUDr. Macůrkem z ÚMG jsme v roce 2019 na unikátním savčím modelu provedli pilotní funkční analýzu 26 missense variant identifikovaných u osob se ZN prsu a ovaria v ČR, která umožnila funkčně kategorizovat tyto missense varianty na neutrální, středně funkční a nefunkční, přičemž rizika vzniku nádorů u nefunkčních missense variant odpovídala rizikům spojeným se známými gPV v *CHEK2*. Na podkladě této studie byl zahájen mezinárodní projekt v rámci ENIGMA konsorcia zaměřený v prvním kole na kategorizaci 430 unikátních missense variant *CHEK2*. Následná case-control studie identifikovala germinální varianty u 2452/73048 žen se ZN prsu a u 1984/88658 populačně specifických kontrol. Pro nosičky identifikovaných nefunkčních missense variant (~0,5 % všech žen s ZN prsu) prokázala jasné zvýšení rizika vzniku ZN prsu (OR=2,83; 95%CI 2,35-3,41), odpovídající riziku nosičství známých gPV v tomto genu.
Zatímco u genů *BRCA1* a *BRCA2* se patogenní missense a sestřihové varianty vyskytují u méně než pětiny nosiček, patogenní sestřihové a missense mutace tvoří téměř 50 % všech gPV v genu *CHEK2*. RNA a funkční

analýzy tak umožňují identifikovat rozsáhlou skupinu nemocných, kterým je následně možné nabídnout adekvátní zdravotní péči umožňující prevenci vzniku ZN.

Vybrané publikace:

1. **Kleiblova P***, Stolarova L*, Krizova K, Lhota F, Hojny J, Zemankova P, Havranek O, Vocka M, Cerna M, Lhotova K, Borecka M, Janatova M, Soukupova J, Sevcik J, Zimovjanova M, Kotlas J, Panczak A, Vesela K, Cervenkova J, Schneiderova M, Burocziova M, Burdova K, Stranecky V, Foretova L, Machackova E, Tavanzis S, Kmoch S, Macurek L, Kleibl Z. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. ***Int J Cancer***. 2019;145(7):1782-1797. doi: 10.1002/ijc.32385. Epub 2019 May 20. PMID:31050813 ($IF_{2019}$= 5.145; **Q1**)

2. Stolarova L*, **Kleiblova P***, Zemankova P, Stastna B, Janatova M, Soukupova J, Achatz MI, Ambrosone C, Apostolou P, Arun B, Auer P, Barnard M, Bertelsen B, Blok M, Boddicker N, Brunet J, Burnside E, Calvello M, Campbell I, Chan SH, Chen F, Chiang JB, Coppa A, Cortesi L, Crujeiras-González A, De Leeneer K, De Putter R, DePersia A, Devereux L, Domchek S, Efremidis A, Engel C, Ernst C, Evans G, Feliubadaló L, Fostira F, Fuentes-Ríos O, Gomez-Garcia E, González S, Haiman C, Hansen T, Hauke J, Hodge J, Hu C, Huang H, Ishak ND, Iwasaki Y, Konstantopoulou I, Kraft P, Lacey J, Lázaro C, Li N, Shao-Tzu Li , Sara Lindström, Adriana Lori, Maria Martinez, Alexandra Martins, Koichi Matsuda, Giuseppe Matullo, Simone McInerny, Kyriaki Michailidou, Marco Montagna, Alvaro Monteiro, Luigi Mori, Katherine Nathanson, Susan Neuhausen, Heli Nevanlinna, Janet Olson, Julie Palmer, Barbara Pasini, Alpa Patel, Maria Piane, Bruce Poppe, Paolo Radice, Alessandra Renieri, nicoletta resta, Marcy Richardson, Toon Rosseel, Kathryn Ruddy, Marta Santamariña, Elizabeth dos Santos, Lauren Teras, Amanda Toland, Amy Trentham-Dietz, Celine Vachon, Alexander Volk, Nana Weber-Lassalle, Jeffrey Weitzel, Lisa Wiesmüller, Stacey Winham, Siddhartha Yadav, Drakoulis Yannoukakos, Song Yao, Valentina Zampiga, Magnus Zethoven, Zewen Zhang, Tomas Zima, Amanda Spurdle, Ana Vega, Maria Rossing, Jesús del Valle, Arcangela De Nicolo, Eric Hahnen, Kathleen Claes, Joanne Ngeow, Yukihide Momozawa, Paul James, Fergus Couch, Libor Macurek, and Zdenek Kleibl. ENIGMA CHEK2gether project: a comprehensive study identifies functionally-impaired CHEK2 germline missense variants associated with increased breast cancer risk. ***Clin Cancer Res***. 2023;29(16):3037-3050. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-23-0212. PMID: 37449874 ($IF_{2023}$= 10.0; Q1, **D1**)

3. **Kleiblova P**#, Cerna M, Zemankova P, Matejkova K, Nehasil P, Hojny J, Horackova K, Janatova M, Soukupova J, Stastna B, Kleibl Z. Parallel DNA/RNA NGS Using an Identical Target Enrichment Panel in the Analysis of Hereditary Cancer Predisposition. ***Folia Biologica*** (Praha) 2024;70,62-73. doi:10.14712/fb2024070010062 ($IF_{2023}$=1.1; Q3)

Pozn: * autoři se podíleli rovným dílem; # korespondenční autor