



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Functional analysis of genetic variants in PALB2 and CHEK2: linking functional impact with cancer risk

Boonen, R.A.C.M.

Citation

Boonen, R. A. C. M. (2023, April 4). *Functional analysis of genetic variants in PALB2 and CHEK2: linking functional impact with cancer risk*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3590202>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3590202>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

CHAPTER 7

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

Publications

Dankwoord

8

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Borstkanker is wereldwijd de meest voorkomende oorzaak van sterfte bij vrouwen. De ontwikkeling van borstkanker ontstaat in veel gevallen waarschijnlijk door een combinatie van risico factoren die afhankelijk kunnen zijn van gedrag, afkomst en/of omgeving. Bij ruwweg 10% van de vrouwelijke borstkanker patiënten is er echter sprake van een erfelijke/genetische aanleg om deze vorm van kanker te ontwikkelen. Binnen families waar borstkanker veel voorkomt, en/of op jonge leeftijd is ontstaan, kunnen vrouwen doorverwezen worden naar een klinisch geneticus voor een erfelijkheidsonderzoek. Er wordt dan onderzoek gedaan naar een klein aantal genen, waarvan de meeste betrokken zijn bij de 'DNA damage response' (een reactie binnen een cel die plaats vindt na het detecteren van DNA-schade). Deze reactie is enorm belangrijk voor een cel, aangezien deze nodig is om de genomische stabiliteit te bewaken. Een afwijking in deze reactie, bijvoorbeeld als gevolg van een genetische verandering, kan er dan ook voor zorgen dat iemand een sterk verhoogd risico heeft om borstkanker te ontwikkelen.

Bij een erfelijkheidsonderzoek zijn er een aantal uitslagen mogelijk. Het kan zo zijn dat er geen genetische veranderingen (ofwel varianten) gevonden worden, of varianten waarvan bekend is dat ze benigne zijn (niet ziekmakend). In dergelijke gevallen lijkt de persoon geen verhoogd risico op borstkanker te lopen, of dit te kunnen overdragen aan eventuele kinderen (althans op basis van de onderzochte genen). Daartegenover is het mogelijk dat er een duidelijke pathogene (ofwel ziekmakende) variant gevonden wordt. In deze gevallen worden de dragers hiervan zo adequaat mogelijk geadviseerd over, bijvoorbeeld, de preventieve maatregelen die genomen kunnen worden. Tot slot is het mogelijk dat er varianten gevonden worden waarvan het effect onzeker is. Deze varianten worden ook wel 'variants of uncertain significance' (VUS) genoemd, en voor dragers hiervan is het dus compleet onduidelijk of ze een verhoogd risico lopen om borstkanker te ontwikkelen en of er bijvoorbeeld ingrijpende maatregelen, zoals risico verlagende chirurgische ingrepen, aanbevolen moeten worden. Als gevolg hiervan kunnen deze varianten voor veel stress zorgen bij dragers, en frustratie bij klinisch genetici.

Om inzicht te krijgen in de pathogeniciteit van een VUS kan er gebruik gemaakt worden van klinische gegevens, bijvoorbeeld data die laat zien of de variant binnen een familie wel of niet segregert met het voorkomen van kanker. Een dergelijke waarneming moet echter statistisch onderbouwd worden om een toevalsbevinding uit te sluiten en daarvoor zijn in het algemeen te weinig families met dezelfde variant beschikbaar. In dat soort gevallen is er dus een ander soort onderzoek nodig om deze VUSsen te interpreteren.

Voor de meeste genen zorgt een pathogene variant voor verlies van eiwitfunctie. Dus een functioneel onderzoek, waarbij er gekeken wordt of een variant effect heeft op de functie van het geproduceerde eiwit in de cel, kan de uitkomst bieden voor het inschatten van de

pathogeniciteit van veel zeldzame VUSsen. In dit proefschrift presenteren we de ontwikkeling en toepassing van een dergelijke functionele analyse, waarbij de focus ligt op twee 'DNA damage response' genen die beide geassocieerd zijn met borstkanker; namelijk *PALB2* (een hoog risico gen voor borstkanker) en *CHEK2* (een gematigd verhoogd risico gen voor borstkanker).

Het *PALB2* eiwit heeft een belangrijke functie in een specifieke vorm van DNA-schade herstel, namelijk de homologe recombinatie (HR). HR zorgt ervoor dat dubbelstrengs DNA-breuken op een foutloze manier gerepareerd worden. Wanneer de functie van het *PALB2* eiwit verstoord wordt door de aanwezigheid van een pathogene variant, kunnen dubbelstrengs DNA-breuken niet goed hersteld worden en kan er dus genomische instabiliteit optreden. Het *CHK2* eiwit, geproduceerd door het *CHEK2* gen, bewaakt de genomische stabiliteit van cellen op een andere manier, namelijk door celdelingen een halt toe te roepen wanneer er DNA-schade is gedetecteerd. Dit geeft een cel de tijd om de DNA-schade te repareren voordat deze definitief de celdeling afrondt. Daarnaast kan *CHK2* in sommige gevallen ervoor zorgen dat een cel in apoptose gaat (geprogrammeerde celdood) wanneer de DNA-schade onherstelbaar is of in te grote mate aanwezig is in het genoom van de cel. Een verstoring in de functie van het *CHK2* eiwit (als gevolg van een pathogene *CHEK2* variant), kan dus op een andere manier leiden tot genomische instabiliteit. Deze genomische instabiliteit, die dus kan optreden als gevolg van een defect in *PALB2* of *CHK2* eiwit functie, kan uiteindelijk resulteren in ongecontroleerde celdelingen en een verhoogd risico om borstkanker te ontwikkelen. In het geval van een defect in *PALB2* eiwit functie (als gevolg van een pathogene variant), gaat het dan om een sterk verhoogd risico. In het geval van een defect in *CHK2* eiwit functie (als gevolg van een pathogene variant), gaat het om een gematigd verhoogd risico.

Voor het interpreteren van VUSsen in zowel het *PALB2* als het *CHEK2* gen, hebben wij functionele *in vitro* testsystemen opgezet waarvoor we muis embryonale stamcellen (mESC) gebruiken. In deze cellen is het muis gen voor *Palb2* of *Chek2* onbruikbaar gemaakt en kan, respectievelijk, het humane *PALB2* of *CHEK2* gen (eventueel inclusief variant) geïntroduceerd worden om dit verlies te compenseren. Voor *PALB2* kunnen we dan (voornamelijk) naar de efficiëntie in HR kijken, en het effect van *PALB2* varianten daarop bestuderen. Voor *CHEK2* varianten daarentegen, kijken we voornamelijk naar de fosforylatie van een doeleiwit van *CHK2*, i.e., Kap1, die op het serine 473 residu specifiek door *CHK2* gefosforyleerd wordt na de detectie van DNA-schade (bijvoorbeeld na röntgenbestraling van cellen). De uitlezing van beide testsystemen (i.e., de mate van DNA-schadeherstel, dan wel de mate van Kap1-fosforylering) zegt iets over de functionaliteit van een *PALB2* of *CHEK2* VUS en kan op een kwantitatieve of semi-kwantitatieve manier gebruikt worden bij het inschatten of een VUS pathogeen of benigne is.

In de **Hoofdstukken 2 en 3** worden twee literatuurstudies gepresenteerd voor, respectievelijk, *PALB2* en *CHEK2*, waarin verscheidene gepubliceerde functionele analyses voor beide genen beschreven worden en op een kritische manier met elkaar worden vergeleken. In de opvolgende onderzoek hoofdstukken wordt in **Hoofdstuk 4** het testsysteem voor *PALB2* gevalideerd door het gebruik van 9 bekende functionele varianten en 12 bekende pathogene (niet functionele) varianten. Vervolgens wordt de functionaliteit van 48 *PALB2* VUSsen geanalyseerd, wat duidelijk laat zien dat er 5 VUSsen, functioneel gezien net zo schadelijk zijn als de 12 pathogene controle varianten. Tevens zien we dat de VUSsen die een functioneel defect laten zien, zich bevinden in het coiled-coil (CC) domein en het WD40 domein van het *PALB2* gen. De schadelijke VUSsen in het CC domein verstoren de interactie tussen het *PALB2* eiwit en het *BRCA1* eiwit, en daarmee als gevolg de HR-efficiëntie. Schadelijke VUSsen in het WD40 domein daarentegen, verstoren de stabiliteit van het *PALB2* eiwit en als gevolg dus ook HR. In **Hoofdstuk 5** worden deze mechanistische bevindingen verder bevestigd met de analyse een nieuwe groep *PALB2* varianten, waarbij tevens nog een aantal schadelijke *PALB2* VUSsen worden geïdentificeerd. Zo laten de resultaten in dit hoofdstuk ook zien dat volledige verwijdering van andere functionele domeinen dan het CC- of WD40-domein (i.e., het ChAM of MRG15 domein) van *PALB2*, geen effect heeft op de functie van het *PALB2* eiwit in HR. Hierdoor is het dus aannemelijk dat VUSsen die zich in deze domeinen bevinden, minder snel een effect zullen hebben op de functie van *PALB2* binnen HR. Daarnaast wordt er een methode gepresenteerd die de functionele karakterisatie van honderden *PALB2* varianten binnen een enkel experiment mogelijk maakt, wat o.a. van groot belang zal zijn voor de interpretatie van het grote aantal *PALB2* varianten dat momenteel (nog) als VUS geclassificeerd is. Tot slot, worden in hoofdstuk 5 onze functionele resultaten geassocieerd met borstkankerrisico middels een 'burden-type' associatie analyse. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van de gegevens uit een grote 'case-control' studie van het Borstkanker Associatie Consortium (BCAC), die voor sommige *PALB2* varianten heeft laten zien hoe vaak de variant gevonden is in een borstkanker patiënt (i.e., case) en/of in een gezonde controle (i.e., control). Deze 'burden-type' associatie analyse laat duidelijk zien dat een verlaagde HR-efficiëntie inderdaad correleert met een verhoogd borstkankerrisico. Deze bevinding vergroot de klinische waarde van de functionele analyse van *PALB2* VUSsen, omdat de varianten die schadelijk zijn met betrekking tot eiwit functie (en al gevolg het risico voor borstkanker verhoging), direct vertaald kunnen worden naar klinisch handelen, vergelijkbaar met hoe het nu voor pathogene varianten gebeurt.

Het onderzoek in **Hoofdstuk 6** is gericht op de validatie van het functionele testsysteem voor *CHEK2* varianten en vervolgens het functioneel testen van 50 *CHEK2* VUSsen. Voor de validatie gebruiken we hier 6 functionele controle varianten en 6 bekende pathogene varianten. Voor deze varianten zien we een duidelijke scheiding in het vermogen

van het CHK2 eiwit om een downstream target, Kap1, te fosforyleren. Terwijl de functionele varianten, als reactie op het voordoen van DNA schade, prima in staat zijn om Kap1 te fosforyleren op serine 473, zijn de pathogene varianten hiertoe niet meer in staat. Wat betreft de 50 *CHEK2* VUSsen zien we vervolgens dat er maar liefst 31 net zo schadelijk zijn als de bekende pathogene varianten en dat er 9 een middelmatig functioneel defect laten zien. Al deze VUSsen lijken verspreid te liggen over de hele sequentie van het *CHEK2* gen (in tegenstelling dus tot *PALB2* waar ze alleen in het CC- en WD40-domein zaten) en hebben voornamelijk een effect op de stabiliteit van het CHK2 eiwit. Een klein aantal *CHEK2* VUSsen lijkt echter schadelijk te zijn door een defect te veroorzaken in de autofosforylatie van CHK2 en/of mogelijk de binding van ATP. Tot slot associëren we in dit hoofdstuk ook de functionele resultaten met borstkankerrisico middels een 'burden-type' associatie analyse, wat laat zien dat de schadelijke *CHEK2* VUSsen met eenzelfde mate van risico geassocieerd zijn als de bekende pathogene *CHEK2* varianten; namelijk een gematigd verhoogd risico voor borstkanker. De VUSsen die resulteren in een middelmatig functioneel defect lijken geassocieerd te zijn met een iets lager maar nog steeds significant verhoogd risico, terwijl de functionele VUSsen niet geassocieerd zijn met een verhoogd risico. Deze associatie analyse is een verdere validatie van ons test systeem en benadrukt wederom het belang van de functionele analyse van VUSsen. Deze informatie blijkt namelijk duidelijk van waarde te zijn voor het interpreteren van deze varianten en het bepalen of deze varianten pathogeen of benigne zijn.

Kortom, dit proefschrift laat zien dat we robuuste testsystemen hebben ontwikkeld die het mogelijk maken om de functionaliteit van *PALB2* en *CHEK2* varianten te bepalen. Deze functionaliteit correleert met de mate van borstkankerrisico en kan dus van enorme waarde zijn bij het bepalen van welke VUSsen pathogeen of benigne zijn. Wanneer dit op een betrouwbare manier bepaald kan worden, kunnen dragers van deze varianten dus beter geadviseerd worden met betrekking tot preventieve maatregelen, of in sommige gevallen (wanneer het al een drager met borstkanker betreft) over de behandelmogelijkheden. Zo kan hopelijk de zorg voor deze VUS-dragers uiteindelijk verbeterd worden.