



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Revize variant nejasného významu u pacientů s dědičnými nádorovými syndromy v kontextu výsledků projektu A-C-G-T.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Michaela Mikuláštková**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Odborný Školitel: RNDr. Magdalena Uvírová, PhD, EUC laboratoře CGB a.s.
Termín odevzdání práce: 2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Michaela Mikuláštková
Název práce	Revize variant nejasného významu u pacientů s dědičnými nádorovými syndromy v kontextu výsledků projektu A-C-G-T.
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	Bakalářská práce se zabývá problematikou interpretace variantami nejasného významu nalezených během testování pacientů s podezřením na dědičný nádorový syndrom. A jejich interpretací v kontextu nově získaných informací o frekvenci variant v genomu české populace analyzovaném v projektu A-C-G-T (Analýza českých genomů pro teranostiku). Hereditární nádorové syndromy tvoří 5-10% všech nádorových onemocnění. Mezi nejčastěji se vyskytující dědiční nádorová onemocnění patří karcinom prsu, vaječníků, kolorekta a dělohy. Metody masivního paralelního sekvenování umožňují rychlou identifikaci klinicky významných variant. V praktické části byla provedena analýza 815 vzorků v letech 2018-2022. Celkem bylo nalezeno 164 variant nejasného významu u pacientů testovaných na hereditární nádorové syndromy. Cílem praktické části bakalářské práce bylo seznámení se s metodou NGS pomocí analýzy vzorků DNA získané z periferní krve pacientů s různými nádory a podezřením z hereditární nádorové predispozice a následná analýza 164 nalezených variant nejasného významu pomocí porovnávání s údaji získanými v projektu A-C-G-T a mezinárodní populační databází gnomAD.
Klíčová slova	Hereditární nádorový syndrom, <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , Masivní paralelní sekvenování, Panelové sekvenování, A-C-G-T, varianty nejasného významu, Klasifikace variant
Počet stran	74
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Michaela Mikuláštková
Title of thesis	Revision of the variants of unclear significance (VUS) in patients tested for hereditary cancer syndromes in the context of the results of the A-C-G-T project
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D
The year of presentation	2023
Abstract	The bachelor thesis deals with the problem of interpretation of variants of unclear significance found during testing of patients with suspected hereditary cancer syndrome. And its interpretation in the context of newly obtained information on the frequency of variants in the genome of the Czech population analysed in the A-C-G-T project (Analysis of Czech genomes for theranostics). Hereditary cancer syndromes account for 5-10% of all cancers. Breast, ovarian, colorectal and uterine cancers are the most common hereditary cancers. Massively parallel sequencing methods allow rapid identification of clinically relevant variants. In the practical part, 815 samples were analyzed between 2018 and 2022. A total of 164 variants of unclear significance were found in patients tested for hereditary cancer syndromes. The aim of the practical part of the bachelor thesis was to learn about the NGS method by analyzing DNA samples obtained from peripheral blood of patients with various cancers and suspected hereditary cancer predisposition and then analyzing the 164 found variants of uncertain significance by comparing them with data obtained in the A-C-G-T project and the international population database gnomAD.
Keywords	Hereditary cancer syndrome, BRCA1, BRCA2, Massively parallel sequencing, Panel sequencing, A-C-G-T, Variants of uncertain significance, Variant classification
Number of pages	74
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 11.5.2023

/vlastnoruční podpis/

Mé velké poděkování patří Mgr. Michaele Smolíkové a Mgr. Jarmile Šímové z EUC laboratoře CGB, a.s., za pomoc při zpracování bakalářské práce. Dále také MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D. za trpělivé vedení bakalářské práce.

Bakalářská práce vznikla za finanční podpory projektu Evropské Unie „Analýza českých genomů pro teranostiku“ (A-C-G-T, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448) a IGA_LF UP_2023_006.

Obsah

Seznam zkratek.....	8
1. Úvod	14
2. Hereditární nádorová onemocnění	14
2.1. Tumor supresorové geny.....	15
2.1.1. Zástupci tumor supresorových genů.....	16
2.2. Onkogeny	16
2.2.1. Zástupci onkogenů.....	16
3. Hereditární karcinom prsu a vaječníku (HBOC)	18
3.1. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a vaječníku (HBOC) a geny <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> 18	18
3.2. Dělení hereditárního karcinomu prsu.....	18
3.2.1. Receptory	19
3.2.1.1. Estrogenové receptory	19
3.2.1.2. Progesteronový receptor	19
3.2.1.3. Her-2 receptor.....	20
3.3. Rizika vzniku hereditárního nádoru	20
3.4. Diagnostika	21
3.4.1. Fyzikální vyšetření.....	21
3.4.2. Mamograf	21
3.4.3. Magnetická rezonance	21
3.4.4. Genetická diagnostika.....	22
3.5. Léčba.....	22
3.5.1. Možnosti léčby.....	23
3.5.1.1. Chirurgická léčba - mastektomie.....	23
3.5.1.2. Radioterapie.....	23
3.5.1.3. Chemoterapie.....	24
3.5.1.4. Hormonální léčba	24
3.5.1.5. Biologická léčba a molekulární terapie	25
4. Geny hereditárních nádorových onemocnění	26
4.1. <i>BRCA1</i> (Breast cancer type 1 susceptibility protein).....	26
4.1.1. Struktura a lokalizace	26
4.1.1.1. Ring doména.....	27
4.1.1.2. Oblast kódovaná exonem 11	27
4.1.1.3. BRCT tandemová doména	27
4.1.2. Funkce.....	27
4.1.2.1. Oprava poškozené DNA.....	27
4.1.2.2. Regulace kontrolních bodů buněčného cyklu	28

4.1.2.3.	Transkripční funkce.....	28
4.1.1.	Mutace	29
4.2.	<i>BRCA2</i> (Breast cancer type 2 susceptibility protein).....	30
4.2.1.	Struktura a lokalizace	30
4.2.2.	Funkce.....	31
4.2.2.1.	Úloha <i>BRCA2</i> v homologní opravě	31
4.2.2.2.	Ochrana replikační vidličky.....	31
4.2.2.3.	Regulace buněčného cyklu	32
4.2.3.	Mutace	32
4.3.	<i>CHEK2</i>	32
4.3.1.	Struktura a lokalizace	32
4.3.2.	Funkce.....	33
4.3.2.1.	Aktivace.....	33
4.3.3.	Mutace	34
4.4.	<i>PALB2</i> (z angl. Partner and localizer of <i>BRCA2</i>)	34
4.4.1.	Struktura a lokalizace	34
4.4.2.	Funkce.....	35
4.4.3.	Mutace	35
5.	Molekulární diagnostika nádorových syndromů	35
5.1.	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	35
5.1.1.	Real-time PCR	36
5.1.2.	Reverzně – transkriptázová PCR (RT-PCR)	36
5.2.	MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	36
5.3.	Sekvenování nové generace (NGS)	37
5.3.1.	Průběh NGS	37
5.3.2.	Hloubka pokrytí	40
5.3.3.	Celogenomové sekvenování (whole genome sequencing, WGS)	41
5.3.4.	Celoexomové sekvenování –whole exome sequencing , WES).....	41
5.3.5.	Cílené sekvenování – hotspot sekvenování	41
5.3.6.	Panelové sekvenování.....	41
5.3.7.	Výhody a nevýhody NGS	43
5.3.8.	Srovnání se Sangerovou metodou	43
5.3.9.	Výsledky genetického testování	43
5.3.9.1.	Nomenklatura	43
5.3.9.2.	Klasifikace detekovaných sekvenčních variant.....	44
6.	Cíle praktické části práce	46
7.	Praktická část	47

7.1.	Biologický Materiál	47
7.2.	Použité chemikálie	47
7.3.	Využité přístroje.....	47
7.4.	Použité nástroje.....	48
7.5.	Příprava sekvenačního panelu Hereditary Cancer Solution (SOPHiA GENETICS) 48	
7.5.1.	Příprava vzorků.....	48
7.5.2.	Enzymatická fragmentace a ligace adapterů.....	48
7.5.3.	Amplifikace knihovny a přečištění knihovny.....	49
7.5.4.	Kvantifikace knihoven a kontrola kvality.....	49
7.5.5.	Poolování knihovny	49
7.5.6.	Hybridizace.....	50
7.5.7.	Navázání hybridizovaných prób na streptavidinové kuličky.....	50
7.5.8.	Sekvenování Miseq.....	51
7.5.9.	Analýza sekvenačních dat.....	51
8.	Výsledky	51
9.	Diskuze	58
10.	Závěr	60
11.	CITACE	61

Seznam zkratk

53BP1	Tumor suppressor p53-binding protein 1 (nádorový supresor p53-vazebný protein 1)
ABRAXAS1	BRCA1 A complex subunit (podjednotka komplexu BRCA1A)
A-C-G-T	Analýza českých genomů pro teranostiku
AF-1/2/3	Aktivační funkční domény 1/2/3
AIB1	Amplified in breast cancer 1 protein (protein amplifikovaný u karcinomu prsu 1)
APC	Adenomatous polyposis coli
ATM	ATM serin/threonová kináza, dříve ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATR serin/threoninová kináza, dříve ataxia telangiectasia and Rad3 related
BACH1	Transcription regulator protein BACH1
BAP1	BRCA1 associated protein 1
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1

BI-RADS	The Breast Imaging Report and Data System
<i>BRCA1</i>	Breast cancer susceptibility gene 1 (gen náchylnosti k rakovině prsu 1)
<i>BRCA2</i>	Breast cancer susceptibility gene 2 (gen náchylnosti k rakovině prsu 2)
BRCT	BRCA1 C Terminus (BRCA1C zakončení)
BRIP1	BRCA1 interacting helicase 1 (BRCA1 onteragující helikáza)
CC	Coiled-coil doména (vinuté cívky)
cd25	Interleukni 2 receptor subnit alpha
CDC2/25-A/B/C	Cyklin-dependentní kináza 2/25-A/B/C
<i>CDH1</i>	<i>gen Cadherin-1</i>
CDK1/2	Cyklin dependentní kináza 1/2
cDNA	Complementary/copy DNA, DNA klonovaných fragmentů neobsahující introny
c-fos	protein c-fos, alternativně AP-1 transcription factor subunit (podjednotka transkripčního faktoru AP-1)
c-Myc	Cellular myelocytomatosis oncogene protein
c-SCR	Proto-onkogen, tyrosin proteinkináza Src
CtBP/ CtIP	C-terminální vazebný protein/c-interagující protin
CZECANCA	Czech cancer panel for clinical application (český onkologický panel pro klinické použití)
dATP	deoxiadenosin trifosfát
dCTP	deoxicytidin trifosfát
dGTP	deoxiguanosin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSB	Dvouřetězcové zlomy
dsDNA	dvouvláknová DNA
dTTP	Deoxythymidin trifosfát
E2	Estradiol
E2F1	E2F transkripční faktor 1
E3	Ubikvitin ligáza
<i>EGFR</i>	Receptor epidermálního růstového faktoru
emPCR	Emulzní PCR
EMSY	BRCA2-interacting transcriptional repressor EMSY (BRCA2-interakční transkripční represor EMSY)

<i>EPCAM</i>	Epithelial cell adhesion molecule gene (Gen pro adhezivní molekulu epiteliálních buněk)
ER	Estrogenový receptor
<i>ERBB2/HER 2</i>	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (Erb-2 receptor tyrosinkinázy 2)
Er α	Estrogenový receptor alfa
Er β	Estrogenový receptor beta
<i>ETS</i>	Erythroblast Transformation Specific
Exo1	exonukleáza 1
<i>FA</i>	<i>Gen pro Fanconyho syndrom</i>
FANCI	BRCA1 interacting helicase 1 (BRCA1 interagující helikáza)
FHA	centrální část proteinu
FISH	Fluorescenční in situ hybridiza
<i>FLCN</i>	Gen folliculin
GADD45	The Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45
gnomAD	Genome Agregation Database (databáze agregace genomu)
HBOC	Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovaria
HER2 receptor	Human epidermal growth factor receptor 2 (Receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2), alternativní zkratka HER2/neu
HGMD	Human Gene Mutation Database (Databáze mutací lidských genů)
HGNC	HUGO Gene nomenclature Commite (Výbor pro nomenklaturu genů HUGO)
HGVS	Human Genom Variation Society (Společnost pro variace lidského genomu)
HMG20b	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1-related protein
HR	homologní rekombinance
<i>H-ras</i>	HRas protoonkogen, GTPasa
HUGO	Human Genome Project (Projekt lidského genomu)
ChaM	Chromatin asociační motiv
<i>CHEK2</i>	checkpoint kináza 2
CHK2	Serine/threonine-protein kináza Chk2
IA	Inhibitor aromáz
ICL	Mezivláknové příčné vazby DNA
IgG	Imunoglobulin G

Indels	Krátké inserce a delece
<i>KRAS</i>	KRAS proto-onkogen, GTPáza
K-ras	GTPáza KRas
Ku80	X-ray repair cross-complementing protein 5 (reparační zkřížený doplňkový protein 5)
LBD	Vazebné domény pro ligand
LOVD	Leiden Open Variation Database (Leidenská otevřená databáze variant)
MAD2	Mitotic spindle checkpoint component MAD2 (Komponenta kontrolního bodu mitotického vřetenka MAD2)
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MDM2	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (E3ubikvitin-protein ligáza Mdm2)
MDM4	Protein Mdm4
<i>MEN1</i>	Menin 1
<i>MET</i>	MET proto-onkogen, tyrosin kinasový receptor
<i>MLH1/2</i>	MutL homolog 1
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
<i>MRE11A</i>	MRE11 homolog, double strand break repair nuclease (nukleáza pro opravu dvouvláknových zlomů)
MRN	Komplex proteinů MRE11-RAD50-NBS1
mRNA	Messenger ribonukleová kyselina
<i>MSH6</i>	MutS homolog 6
mTOR	The mammalian target of rapamycin (savčí cíl rympanicinu)
<i>MUTYH</i>	mutY DNA glycosylase (mutY DNA glykodyláza)
<i>Myc</i>	MYC proto-onkogen
<i>NBN</i>	nibrin
NCOA-1	Nuclear receptor coactivator 1 (koaktivátor jaderného receptoru 1)
<i>NF1</i>	Neurofibromin 1
<i>NF2</i>	Neurofibromin 2
<i>NF-Kappa-B</i>	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (nukleární faktor zesilujících lehkých řetězců kappa aktivovaných B buněk)
NGS	Nová generace sekvenování
NHEJ	Nehomologní rekombinace
<i>N-ras</i>	NRAS Proto-Onkogen, GTPáza

OB 1/2/3	Oligosacharidové domény 1/2/3
p53	Cellular tumor antigen p53 (buněčný nádorový antigen p53)
PALB2	Partner and localizer of BRCA2 (partner a lokalizátor BRCA2)
PARP	Poly ADP ribózapolymerázy (poly ADP ribóza polymeráza)
PCR	Polymerázová řetězová reakce
<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha (Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát-3-kináza katalytická podjednotka alfa)
PLK1	Polo like kinase 1 (polo-like kináza1)
<i>PMS2</i>	PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component (komponenta systému Mismatch Repair)
<i>PMS2CL</i>	PMS2 C-Terminal Like Pseudogene (PMS2 C- koncový pseudogen)
PolyPhen-2	Polymorphism Phenotyping v2 (fenotipizace polymorfismu v2)
PR	Progesteronový receptor
PR-A/B	Progesteronový receptor-A/B
pRB	Retinoblastomový protein
<i>PTEN</i>	Tumor supresorový gen s fosfatázovou aktivitou a sekvenční homologii
q-PCR	kvantitativní Polymerázové řetězové reakce
RAD5	DNA repair protein RAD5 (DNA reparační protein RAD5)
<i>RAD50</i>	<i>RAD50</i> double strand break repair protein (<i>RAD50</i> protein pro opravu dvouřetězcových zlomů)
<i>RAD51</i>	<i>RAD51</i> recombinase (<i>RAD51</i> rakombináza)
<i>RAD51C</i>	<i>RAD51</i> Paralog C
<i>RB1</i>	<i>Retinoblastomový gen 1</i>
<i>REL</i>	Proto-onkogen c-Rel
RELA	Transcription factor p65 nebo nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit (Transkripční faktor p65 nebo jaderný faktor NF-kappa-B p65 podjednotky)
RNA	Ribonukleová kyselina
RNA polymeráza II.	ribonukleotidová polymeráza II
RPA	replikační protein A
RT-PCR	real-time PCR (PCR v reálném čase)
SCD	cluster domains (kalastrové domény)

SERD	selektivní deregulátory estrogenových receptorů
SERM	selektivní modulátory estrogenových receptorů
SNP	jednonukleotidových polymorfismů
SNV	jednonukleotidové záměny
SQ	Serin-glutamová zbytky
SRC1/NCOA1	Koaktivátor jaderného receptoru 1
ssDNA	Jednořetězcová DNA
<i>STK11</i>	Serin/threoninová kináza 11
TD	Věžová doména
TNBC	Triple negativní karcinom prsu
TOPBP1	Topoisomerase 2-binding protein1
<i>TP53</i>	Tumor supresorový gen kóduje protein p53
TQ	Threonin-glutamové zbytky
UCV	Neznámé klasifikované varianty
UCV	Neznámé klasifikované varianty
<i>VEGF</i>	<i>Vaskulární endoteliální růstové faktory</i>
VUS	Varianty nejasného významu
WD40	beta-transducin repeat
WES	Celoexomové sekvenování
WGS	Celogenomové sekvenování
<i>XRCC2</i>	X-ray repair cross complementing 2

1. Úvod

Bylo zjištěno, že nemalé procento nádorových onemocnění je děděno v rámci rodiny. Mezi nejznámější a nejvíce prozkoumaná takto děděná nádorová onemocnění patří hereditární karcinom prsu a vaječníků a hereditární karcinomy střev. Predispozice pro tyto onemocnění jsou nejčastěji mutace v tumor supresorových genech a onkogenech. Predispoziční geny jsou v současné době vyšetřovány panelovým sekvenováním pomocí NGS –sekvenování nové generace. Jedno panelové sekvenování se zaměřuje na vyšetření více různých predispozičních genů najednou podílejících se na vzniku odlišných hereditárních onemocněních. Pro přípravu vzorků pro panelové sekvenování se často používají komerční kity a samotné sekvenování probíhá automaticky v sekvenátorech. Analýza a vyhodnocení výsledků rozdělí nalezené varianty podle jejich patogenity. Pokud se varianty podílí nebo zapříčiňují vznik nádorového onemocnění, řadí se mezi patogenní nebo pravděpodobně patogenní. Pokud se nepodílí nebo není příčinou vzniku nádorového onemocnění řadí se mezi benigní nebo pravděpodobně benigní. Pokud není jasný význam varianty na podílu vzniku onemocnění řadí se mezi varianty nejasného významu. Rozdělení do těchto kategorií je vypracováváno pomocí několika kritérií např. podle zastoupení variant v populační databázi, databáze asociací variant s onemocněním, podle vyhodnocení výpočetních programů, které předpovídají dopad varianty na strukturu a funkci proteinu. Díky získání nových informací a rozšíření například populačních databází může dojít k reklasifikaci variant nejasného významu a určení přesnější diagnózy, určení vhodnější léčby. Mezi nejznámější populační databáze patří gnomAD, který ovšem zahrnuje genom české populace mezi genom evropské nefínské populace, což znamená, že zde nemohou být vidět specifické varianty pro českou populaci. Projekt A-C-G-T si klade za cíl vytvořit genom ryze české populace, právě k identifikaci variant specifických pro českou populaci. Toto by mohl být jeden z důvodů k pozdější reklasifikaci některých variant nejasného významu. Cíle této práce je seznámení s hereditárními nádorovými onemocněními se zaměřením na karcinom prsu a predispozičními geny, které jej způsobují, seznámení s metodou nové generace sekvenování a zaměření na možnosti reklasifikace detekovaných variant v souboru pacientů s hereditárními nádorovými onemocněními.

2. Hereditární nádorová onemocnění

Hereditární nádorová onemocnění patří mezi dědičná onemocnění. Je pro ně typický opakovaný výskyt příslušného nádorového onemocnění v rodině, nízký věk při diagnóze nádorového onemocnění, vícenásobný či opakovaný výskyt nádorového onemocnění u postižené osoby (Šípek jr. 2014). Hereditární karcinomy jsou děděny autosomálně dominantně

s neúplnou, avšak velmi vysokou penetrancí (Hruška et al. 2019), kdy jsou postižené osoby většinou heterozygoti a k projevu choroby stačí přítomnost jedné mutantní alely (Genetika 2008). Hereditární nádorová onemocnění jsou způsobena hlavně mutací tumor supresorových genů a proto-onkogenů.

2.1. Tumor supresorové geny

Jsou stěžejní geny zapojené do opravy poškozené DNA, do inhibice buněčného dělení, indukci apoptózy a potlačení metastáz. (Wang et al. 2019). Mnoho z dnešních znalostí o tumor supresorových genech pochází z prvně objeveného Retinoblastomového genu (*RB*), jehož poškození způsobuje retinoblastom, což je zhoubný nádor sítnice. Pacienti s dědičným poškozením *RBI* genu mají až 10 000 větší šanci vzniku tumoru než zbytek populace, zároveň mají vyšší riziko ke vzniku sarkomů. Dědičné mutace *RB* genu způsobují vznik retinoblastomu většinou v obou očích, zatímco sporadické pouze v jednom. Na základě těchto informací vymyslel Alfred Knudson teorii „Two-hit hypothesis“ (teorie dvojího zásahu), kdy stanovil, že u dětí s nedědičným retinoblastomem jsou potřeba dvě nezávislé mutace, zatímco u dětí s dědičným retinoblastomem je potřeba jedna nezávislá mutace, protože druhá je zděděná. Tato teorie byla všeobecně přijata jako mechanismus působení pro všechny tumor supresorové geny, ale protože neseseděla na některé typy dědičných nádorových onemocnění (Joyce et al. 2023) v roce 1997 Kenneth W. Kinzler a Bert Vogelstein rozdělili tumor supresorové geny na dvě skupiny gatekeeper a caretaker. Gatekeeper geny přímo regulují růst buněk, pokud mají obě alely inaktivní dochází k nekontrolovatelnému množení buněk. Caretaker geny neřídí přímo buněčný cyklus, ale opravují poškozenou DNA. Inaktivita jejich alel výrazně zvyšuje riziko zhoubné mutace (Kinzler et al. 1997). Na základě těchto dvou teorií jsou pozorovány tři důležité vlastnosti tumor supresorových genů: 1) tumor supresorové geny jsou recesivní ve všech buněčných úrovních, v tumorech mají většinou inaktivní obě alely, 2) dědičnost jedné mutantní alely zvyšuje náchylnost k tvorbě nádoru, 3) stejné geny jsou většinou inaktivovány u sporadických rakovin. Tumor supresorové geny lze na základě jejich funkce rozdělit do pěti skupin: 1) geny, které kódují intercelulární proteiny stěžejní v buněčném cyklu (např. *RBI*). 2) geny kódující receptory a převodníky buněčných signálů, které organizují signály inhibující buněčnou proliferaci, 3) geny kódující kontrolní proteiny (např. *BRCA1*), 4) geny kódující proteiny, navozující apoptózu (např. *TP53*), 4) geny kódující proteiny zapojené do opravy DNA (např. *MSH2*) (Joyce et al. 2023).

2.1.1. Zástupci tumor supresorových genů

Retinoblastomový gen (*RBI*) je jeden z klíčových regulátorů buněčného cyklu. kóduje retinoblastomový protein (pRB), který se váže s transkripčními represory E2F1, čímž zabraňují přejít buňkám z G fáze buněčného cyklu do S fáze buněčného cyklu, díky tomu se buňky nemohou nekontrolovatelně dělit. *RBI* může inhibovat různé druhy tumorů a hraje nepostradatelnou roli v nádorových onemocnění jako například retinoblastom, malobuněčný karcinom plic, osteosarkom, rakovina slinivky břišní, rakovina prsu (Yun et al. 2011).

TP53 tumor supresorový gen kóduje protein p53. Tento protein kontroluje expresi a aktivitu proteinů, které zastavují buněčný cyklus, podílí se na stárnutí buňky, opravě DNA a apoptóze. Jeho poškození vede k replikaci buněk s poškozenou DNA a ztrátě apoptózy

Tumor supresorový gen s fosfatázovou aktivitou a sekvenční homologii (PTEN) kódující lipid fosfatázy, který působí jako negativní regulátor fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K)-AKT a cíle signálních drah mTOR (mammalian target of rapamycin). Tyto signální dráhy jsou důležité pro buněčnou proliferaci, průběh buněčného cyklu a apoptózu. *PTEN* také udržuje pod kontrolou adhezi, angiogenezi a hraje roli ve stabilizaci celého genomu.

NF1 tumor supresorový gen kóduje GTPasu neurofibromin 1, která funguje jako negativní regulátor RAS signální dráhy (řetězec proteinů, který přenáší signál z receptorů na povrchu buňky k DNA v jádře buňky). Mutace zárodečné linie tohoto genu způsobuje Neurofibromatózu typu 1, což je nemoc spojená s tvorbou neurofibromů.

NF2 tumor supresorový gen kóduje cytoskeletální protein neurofibromin 2. Mutace tohoto genu vede k neurofibromatóze typu 2, která zvyšuje riziko bilaterálního schwannomu (Joyce et al. 2023). Mezi tumor supresorové geny patří dále *BRCA1* a *BRCA2*, které budou popsány v dalších kapitolách.

2.2. Onkogeny

Onkogeny jsou geny vyskytující se u lidí, savců, ptáků a nižších organismů (např. drosophila) se schopností stát se rakovinovou buňkou. Vznikají z proto-onkogenů, které hrají důležitou roli v buněčné proliferaci. Můžou vznikat několika způsoby například bodovou mutací, chromozomální přestavbou (umístění proto-onkogenu vedle regulační oblasti imunoglobulinového genu, což vede k nesprávné expresi proto-onkogenu), amplifikací nebo pomocí retrovirů.

2.2.1. Zástupci onkogenů

Onkogeny se dělí na čtyři třídy:

- 1) Onkogeny třídy I souvisí se syntézou povrchových buněčných receptorů. Patří sem například gen *src*, který kóduje enzym tyrosinkinázu Kináza fosforyluje tyrosin a má regulační funkci.
- 2) Onkogeny třídy II jsou často nalézány v lidských tumorech. Jejich proteinové produkty ovlivňují buněčný metabolismus. Patří sem *H-ras*, *K-ras*, *N-ras* (Gurbachan 2014). Všechny tři geny patří mezi ras onkogeny a jsou podobné G-proteinům. G-proteiny přenáší proliferací signál iniciovaný extracelulárními hormony a růstovými faktory. Aktivace těchto genů je způsobena mutací na kodonech 12,13 a 61. Celkový výskyt aktivovaných ras genů v lidských nádorech se odhaduje na 10-15%. Číslo se ovšem může lišit u specifických nádorů. Například u adenokarcinomu plic dosahuje 50% naproti tomu u primárního nebo metastazujícího karcinomu prsu jsou zřídka kdy pozorovány aktivované ras geny (Henderson et al. 1991).
- 3) Onkogeny III. třídy regulují jadernou aktivitu a pravděpodobně buněčný cyklus (Gurbachan 2014). Patří sem *myc*, jehož produkt je schopný regulovat buněčný cyklus, růst a metabolismus buněk, diferenciaci, apoptózu, angiogenezi a transformaci. Nachází se na 8. chromozomu (Hesketh 1997). *Myc* je aktivován u řady různých nádorů, jako je malobuněčný karcinom plic, karcinom prsu, osteosarkom, glioblastom, karcinom děložního čípku, myeloidní myelom, akutní lymfoblastická leukémie, Burkittův lymfom a neuroblastom (Chung et al. 2017).
- 4) Onkogeny IV. třídy jsou relativně nepříbuzné onkogeny, z nichž některé produkují faktory buněčného růstu. Patří zde například *ERB*, *REL*, *ETS*. (Gurbachan 2014). Onkogeny z rodiny *ETS* jsou transkripčními faktory, mezi které patří například *ETS1* a *ETS2*. *ETS1* se nachází na 11 chromozomu. *ETS2* se nachází na 21 chromozomu. *ETS1* je exprimován u nádorů periferního nervového systému (neuroblastomů a dalších nádorů) a u Ewingova sarkomu. Jeho minimálně 4 sestříhané formy se nacházejí u hematologických onemocnění například lymfocytární leukémie. Onkogen *REL* se nachází na 2 chromozomu. *REL* může hrát roli v diferenciaci a lymfopoéze. Jeho významným paralogem je *RELA*, který je součástí pleiotropního transkripčního faktoru NF-kappa-B. Ten se podílí imunitě, diferenciaci, buněčný růst, tumorigenezi a apoptóze. *REL* onkogen je spojován s B buněčným lymfomem a ne Hodgkinsonými lymfomy (Hesketh 1997) onkogen *ERB2* běžně označován jako *HER2* patří do rodiny EGFR (Hudis 2007). Tento gen kóduje receptory pro epidermální růstový faktor (EGF), které patří mezi receptorové tyrosinkinázy (Badache et al. 2006). *HER2* je amplifikován a/nebo nadměrně exprimován u 20-30 % invazivních karcinomů prsu (Hudis 2007).

3. Hereditární karcinom prsu a vaječníku (HBOC)

3.1. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a vaječníku (HBOC) a geny *BRCA1*, *BRCA2*

Předpokládá se, že 20% hereditárních karcinomů prsu je způsobeno mutacemi v tumor supresorových genech *BRCA1* a *BRCA2*. Mezi nejčastější mutace v těchto genech patří krátké inserce a delece, které způsobují posun čtecího rámce, předčasné ukončení translace a vytvoření zkráceného, nefunkčního proteinu. Mutace v dalších vysoce rizikových genech, jakou je *TP53*, *PTEN*, *STK11*, jsou zodpovědné za asi 1% hereditárních karcinomů prsu. Přítomnost hereditární mutace genů *BRCA1* a *BRCA2* charakterizuje Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovaria (HBOC). Gen *BRCA1* se nachází na 17. chromozomu (17q21) a gen *BRCA2* na 13. chromozomu (13q12-13). Oba dva geny kódují proteiny, který se podílí na stabilitě genomu, jsou součástí procesů řídících homologní rekombinanci a reparační procesy indukované DNA, účastní se aktivace transkripce, remodelace chromatinu a regulace buněčného cyklu. (Foretová et al. 2016).

3.2. Dělení hereditárního karcinomu prsu

Nádory se mohou dělit podle mikroskopické klasifikace histologického vyšetření na čtyři základní skupiny. 1) lobulární karcinom in situ – nádorová tkáň vychází z buněk lobulů (lalůčků) ze kterých se skládá normální prsní tkáň. In situ značí, že nádorové buňky neprorůstají přes bazální membránu. 2) duktální karcinom in situ – nádorové buňky napodobují buňky ductů (vývodů) a neprorůstají přes bazální membránu 3) duktální invazivní karcinom – nádorové buňky napodobují buňky ductů a mohou metastázovat. 4) lobulární invazivní karcinom – nádorové buňky napodobují buňky lobulů a mohou metastázovat. Nádory se dále mohou dělit podle stupně diferenciace na grade 1 až 3, kdy nádory s grade 1 vykazují pomalou diferenciaci a malou agresivitu, zatímco nádory s grade 3 rychlou diferenciaci a tendenci metastázovat. Kromě histologického vyšetření se k rozdělení nádorů, určení jejich velikosti a stupně diferenciace používá imunohistochemické a molekulární vyšetření. To je založené na přítomnosti receptorů pro estrogen, progesteron a onkoprotein HER-2/neu (Ryška 2010). Na základě profilů genové exprese byly charakterizovány základní typy karcinomu prsu: luminální A, luminální B, HER-2 pozitivní a basal like a normální tkáň prsu podobný typ (normal-like) (Staněk 2021). Luminální A karcinomy mají nízkou proliferační aktivitu, jsou ER+ (ER-pozitivní) a zpravidla i PR+ (PR-pozitivní), bez exprese HER2 (HER2-negativní). Luminální B karcinomy jsou podobné luminálním A karcinomům,

ale mají vyšší proliferační aktivitu a mohou být HER2+ nebo HER2-. Jejich biologické chování je významně agresivnější (Ryška et al. 2015).

3.2.1. Receptory

3.2.1.1. Estrogenové receptory

Estrogenové receptory ER α a ER β jsou členy rodiny hormonálních receptorů a odlišně regulují transkripci (Fumarola 2017). Nejsou-li ER aktivované, z větší části se nacházejí v buněčné cytoplazmě (Lukešová and Kopecký 2014). ER α je charakterizován jako klíčový faktor karcinogeneze prsu (Fumarola 2017). ER α receptor se skládá z vazebné domény pro ligand (LBD), DNA závěsné domény a DNA vazebné domény. K aktivaci ER α dochází díky vazbě k ligandu, která vede ke vzniku dimeru a vazbě na DNA v sekvencích nazývaných estrogen-responzivní elementy (ERE). Tyto oblasti jsou klasifikovány jako promotory a enhancery, přičemž 97% vazeb ER α se odehrává v distálních enhancerech (Magnani et al. 2017). Tato transkripce je podpořena koaktivátory jako jsou proteiny amplified in breast cancer 1 (AIB1), koaktivátor jaderného receptoru 1 (NCOA-1/SRC1). Transkripce může být snížena vazbou korespondujících proteinů. Dalším způsobem aktivace ER α je jeho navázání na DNA prostřednictvím protein-proteinových reakcí s jinými transkripčními faktory, tedy nepřímé navázání na DNA. Tento mechanismus se podílí na regulaci genů reagujících na estrogenu jako jsou *cyklin D1*, *c-fos*, *c-Myc*. ER α může být aktivován také nengenomicky díky subpopulaci membránově vázaných estrogenů (Fumarola 2017) (u estrogenu například ER α 66 skládající se z izomerů ER α 46 a ER α 36 (Voňka et al. 2019), které reagují s membránovými receptory (např. receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) a HER2), což vede k aktivaci různých signálních kaskád například dráhy Ras/Raf/mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK). V nepřítomnosti estrogenů je ER α aktivován fosforylací na více místech pomocí různých kináz (např. proteinkináza A (PAK), MAPK, c-Scr) (Fumarola 2017). Fyziologickým ligandem ER α / β je estradiol (E2). Jejich interakce je zodpovědná například za E2 indukovanou proliferaci prsní tkáně (Ellmann et al. 2009).

3.2.1.2. Progesteronový receptor

Progesteronový receptor (PR) se stejně jako ER řadí mezi jaderné receptory, které regulují expresi cílených genů v reakci na hormonální podmět. PR se vyskytuje ve dvou izomorfách PR-A a PR-B, které vznikají z jednoho genu na dvou různých startovacích kodonech. Rozdíl mezi nimi je v délce, kdy je PR-A kratší než PR-B, a v aktivačních funkčních doménách (AF), kdy PR-B obsahuje kromě AF-1 a AF-2 navíc AF-3. Tato funkční doména nemůže být inhibována inhibiční funkční doménou, která se nachází na obou N-koncích izoform. Díky

tomu může PR-B působit jako silný aktivátor transkripce, naopak PR-A jako dominantní represor transkripce. Inhibiční funkční doména je funkčně nezávislá a přenosná, pokud je umístěna před ER může potlačit jeho aktivitu (Gao et al. 2002). Fyziologickým ligandem je progesteron. (Ellmann et al. 2009). Reakcí PR receptoru s progesteronem dochází ke konformačním změnám PR receptoru, dimerizaci, fosforylaci a jaderným změnám. Tyto reakce vedou k navázání komponentů PR do regulačních oblastí cílených genů a k následné regulaci transkripce (Gao et al. 2002). Exprese progesteronového receptoru (PR) se používá jako biomarker funkce estrogenového receptoru $ER\alpha$, ale jeho funkční úloha signalizace je nejasná (Mohammed et al. 2015).

3.2.1.3. Her-2 receptor

Receptor HER-2 se řadí mezi receptory epidermálních růstových faktorů (EGFR) společně s HER-3, HER-4, HER-1. Jejich struktura se skládá z extracelulární domény, která je bohatá na cystein a váže ligand, transmembránové domény a intracelulární tyrozinázové domény. Aktivace HER receptoru začíná vazbou ligandu, která vyvolá konformační změnu, vznik dimeru a fosforylaci intracelulární domény. Tyrozinové zbytky vážou intracelulární signální molekuly, což vede k aktivaci drah druhého posla a zkříženému působení s jinými transmembránovými signálními drahami. HER-2 je na rozdíl od ostatních členů neustále v aktivovaném stavu. Jeho aktivita je zjišťována heterodimerními partnery vázanými na ligand (Moasser 2007).

3.2.1.4. Triple negativní karcinom

Triple negativní karcinom prsu (TNBC) je agresivní podtyp karcinomu prsu. Je charakteristický absencí exprese estrogenového, progesteronového receptoru a HER2 receptoru. Projevuje se časným metastázováním a vysokým rizikem relapsu. U 9-21% pacientek s TNBC se vyskytuje mutace BRCA1. Až 39% pacientek s TNBC mladších 40 let nesou mutace na jednom z genů *BRCA* (Holánek et al. 2019).

3.3. Rizika vzniku hereditárního nádoru

Celoživotní riziko vzniku hereditárního karcinomu prsu u nosiček s mutací v genu *BRCA1* je 40-80% a u nosiček s mutací *BRCA2* 18-88% (Palácová 2019). Do 40let onemocní 19% nosiček mutace *BRCA1* a 12% nosiček a s mutací v *BRCA2* (Puchmajerová et al. 2018). Muži s mutací v gene *BRCA1* mají celoživotní riziko karcinomu prsu cca 1,2% a s mutací *BRCA2* 0,8% (Petráková et al. 2016). Dalším z genů rizikových pro vznik nádoru prsu je *CHEK2* kódující kinázu CHK2 kontrolního bodu buněčného cyklu, která se podílí na opravě DNA. Mutovaná verze *CHEK2* ztrácí kinázovou aktivitu. Tato mutace se vyskytuje u 1,1% zdravé populace a zvyšuje riziko rakoviny prsu u žen na dvojnásobek (Meijers-Heijboer et al. 2002).

3.4. Diagnostika

3.4.1. Fyzikální vyšetření

Karcinom prsu může být diagnostikován fyzikálně, kdy dochází k vyšetření prsní žlázy a mízních uzlin v podpaží (“Diagnostika karcinomu prsu” 2018).

3.4.2. Mamograf

Je rentgenová zobrazovací metoda, která se využívá i při prevenci (“Diagnostika karcinomu prsu” 2018). Při nálezů se používají hodnotící kategorie dle BI-RADS (The Breast Imaging Report and Data Systém) (Tab.1) (Slobodníková et al. 2012). K diagnostice u mladých žen a jako doplňkové vyšetření při nálezů na mamografu se využívá ultrazvuk. Jako doplňkové vyšetření u vysoce rizikových žen se využívá magnetická rezonance. Ke konečnému potvrzení nebo vyvrácení nálezů se využívá biopsie (“Diagnostika karcinomu prsu” 2018).

Tab.1: Kategorie nálezů dle The Breast Imaging Report and Data Systém (RTG – rentgenové vyšetření, USG – ultrazvukové vyšetření) a pravděpodobností rizika karcinomu prsu.

kategorie	RTG a USG rysy	Pravděpodobnost rizika a Ca
BI-RADS 1	bez patologie	0%
BI-RADS 2	benigní črty	0%
BI-RADS 3	pravděpodobně benigní	pod 3%
BI-RADS 4a	pravděpodobně maligní	3 - 45%
BI-RADS 4b	pravděpodobně maligní	46 - 75%
BI-RADS 4c	pravděpodobně maligní	76 - 95%
BI-RADS 5	vysoce suspektní z malignity	více než 95%
BI-RADS 6	histologicky verifikovaný Ca	100%

3.4.3. Magnetická rezonance

Magnetická rezonance prsu má svou nespornou roli v rámci dispenzarizace žen s vysokým rizikem vzniku karcinomu, v upřesnění lokálního rozsahu již diagnostikovaného karcinomu, při restagingu v průběhu neoadjuvantní terapie, při pátrání po primárním ložisku při nálezů axilárních metastáz, při ne zcela jasném nálezů na mamografii a sonografii a v neposlední řadě u již odoperovaných pacientek pro karcinom prsu k rozlišení, eventuálně rezidua od pooperačních změn (Coufal et al. 2011). tato metoda by neměla nahrazovat mamografii, ale měla by ji doplňovat. Touto metodou je možné detekovat tzv. okultní léze, které dosud žádné morfologické změny, ale mají rozsáhlou patologickou neovaskularizaci (Coufal et al. 2017). Při nálezů se používají hodnotící kategorie dle BI-RADS (Tab.1) (Slobodníková and et al. 2012).

3.4.4. Genetická diagnostika

Genetické testování mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* pro potvrzení diagnózy se provádí u žen podle indikačních kritérií schválených Společností lékařské genetiky a genomiky. U sporadických forem při výskytu epitelového karcinomu ovaria/tuby/primárního peritoneálního karcinomu v jakémkoliv věku, triple negativního karcinomu prsu do 60 let, unilaterálního karcinomu prsu do 45 let (do 50 let pokud není známá vůbec rodinná anamnéza), dvou samostatných primárních karcinomů prsu, první do 50 let, nebo oba do 60 let, duplicity karcinomu prsu a slinivky v jakémkoliv věku, karcinomu prsu u muže v jakémkoliv věku. U familiárních forem jsou indikační kritéria následující: pacient má alespoň tři přímé příbuzné (včetně probandky) s karcinomem prsu v jakémkoliv věku nebo minimálně 2 přímé příbuzné (včetně probandky) s karcinomem prsu, alespoň jedna diagnostikovaná ve věku pod 50 let, nebo obě do 60 nebo probandku s karcinomem prsu do 50 let s přímým příbuzným s nádorem spojeným s HBOC (především karcinom slinivky, prostaty) (Foretová et al. 2016). Jednou z hlavních metod molekulárně-genetického testování u hereditárních nádorových onemocnění je masivní paralelní sekvenování velkého množství genů (Foretová et al. 2019). Technologie umožňuje masivní paralelní sekvenování tisíce molekul DNA současně, čímž se významně sníží doba potřebná k přečtení a cena (Vojtěšek et al. 2014). Mezi další výhody patří zachycení kombinace mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* nebo kombinace mutací v *BRCA* genech s jinými geny nádorových syndromů (Foretová et al. 2019). I když dostupné technologie NGS využívají rozdílnou chemii, sdílí tři společné kroky: 1) příprava templátů, vytvoření knihovny amplifikátorů, 2) sekvenování a detekce inkorporovaných nukleotidů, 3) analýza dat (Vojtěšek et al. 2014). V ČR musejí akreditovaná pracoviště používat NGS panely které zahrnují minimálně 22 určených genů (Foretová et al. 2019). Metoda NGS je rozebírána ve 4 kapitole.

3.5. Léčba

Léčba karcinomu prsu se může dělit podle účinku na systémovou a lokální nebo podle vztahu k onemocnění na neoadjuvantní, adjuvantní a paliativní. Neoadjuvantní léčba se podává před operací. Jejím cílem je zmenšit nádor před operací a tím umožnit nebo usnadnit samotnou operaci. Cílem adjuvantní léčby je zničit co nejvíce mikroskopických zbytků karcinomů nebo mikrometastáze. Adjuvantní léčba probíhá po chirurgické léčbě, kdy je odstraněno primární ložisko karcinomu.

Paliativní léčba probíhá u pacientů v terminálním stádiu onemocnění. Jejím cílem je zachovat kvalitu života.

Lokální léčba působí v určitém místě, zatímco systémová léčba působí v celém organismu. (Petráková et al. 2018)

3.5.1. Možnosti léčby

3.5.1.1. Chirurgická léčba - mastektomie

Chirurgická léčba je součástí komplexní léčby karcinomu prsu. Do této sekce léčby řadíme chirurgii samotné mléčné žlázy, chirurgii lymfatických uzlin, chirurgii vzdálených metastáz a rekonstrukční chirurgii. V rámci tohoto typu léčby se provádí prs zachovávající chirurgické výkony. Tyto výkony se neprovádí pokud jsou nádory větší než 4cm, při multifokálním nálezu, difúzní mikrokalcifikaci, nepoměru mezi velikostí prsu a nádoru. V těchto případech dochází k radikálním chirurgickým výkonům. Mezi ně patří simplexní (totální) mastektomie, modifikovaná radikální mastektomie podle Pickrena, subkutánní mastektomie (Wienberg et al. 2012), axilární disekce, což je odstranění podpažních uzlin pro zjištění, zda se zde nádor rozšířil (Petráková et al. 2018) a biopsie sentinelové uzliny. Sentinelová uzlina je první uzlina, která drénuje nádor, je zde tedy nejvyšší pravděpodobnost záchytu metastáz. Součástí chirurgické léčby je rekonstrukční operace prsu (Wienberg et al. 2012).

3.5.1.2. Radioterapie

Radioterapie se řadí mezi lokální léčbu nádorů využívající paprsky s velmi vysokou energií nebo proud částic (např. elektronů). Paprsky a částice jsou produkovány lineárními urychlovači nebo vyzařovány radioaktivními prvky (např. kobalt, iridium). Radioterapie může probíhá buď zevně nebo vnitřně, v kombinaci s jinou léčbou (např. chemoterapii). Zevní radioterapie-teleradioterapie probíhá podle předem stanoveného ozařovacího plánu u většiny nádorů 5 dní v týdnu. Celkovou dávku záření a počet sezení stanovuje lékař na základě velikosti, druhu a umístění nádoru a stavu pacienta. Teleradioterapie využívá paprsků X, elektronových svazků nebo gama paprsků z kobaltových ozařovačů. Vnitřní radioterapie-brachyradioterapie umožňuje umístit zdroj záření přímo k rakovinovým buňkám. Umístění probíhá při celkové nebo částečné anestezii, kdy jsou do tkání implantovány plastové trubičky s drátkem nejčastěji s radioaktivními izotopy cesia nebo rubidia. Mezi nejčastější vedlejší účinky léčby karcinomu prsu radioterapií patří únava a zarudnutí kůže ozařovaného místa. Kůže může začít svědit, sloupávat se, tyto nežádoucí účinky by měly během 4-6 měsíců odeznít. Únava je nejspíše způsobena snížením počtu červených krvinek, nespavostí, bolestí, snížené chuti k jídlu nebo při stresu, který doprovází chorobu. Pocitu únavy může napomoc velká spotřeba energie při dennodenním docházení na terapie a hojením během léčby (Stáhalová 2008).

3.5.1.3. Chemoterapie

Chemoterapie patří mezi systémovou léčbu nádorových onemocnění, kdy se účinná látka obsažená v cytostatikách vpravuje většinou intravenózně do těla, méně často pak ve formě tablet. Cytostatika zasahují do procesu množení nádorových buněk a tím je ničí, zároveň s nimi ničí také ostatní rychle se množící buňky jako jsou krvinky, buňky sliznic a vlasových folikulů. Z toho plynou nežádoucí účinky chemoterapie jako je vypadávání vlasů, pocit nevolnosti a nechutenství, zvracení, změny v menstruačním cyklu, pokles bílých krvinek (Petráková et al. 2019). Léčba chemoterapií se dělí na adjuvantní a neoadjuvantní. Pro adjuvantní léčbu se používají např. antracykliny a taxany. Současná hodnocení ukázala, že adjuvantní chemoterapie je přínosná pro mladé pacientky a snižuje riziko úmrtí a recidivy. Naopak u starších pacientek a pacientek po menopauze převažují rizika chemoterapie nad jejím přínosem. Dále současné poznatky ukazují, že adjuvantní chemoterapie by měla být zahájena 4-6 týdnů po operaci a aplikována v 6-8 cyklech. Neoadjuvantní chemoterapie by měla probíhat minimálně šest cyklů před operací. Kontrola léčby se provádí pomocí mamografu, ultrazvuku. Kontrola odpovědi na léčbu je jednou z výhod neoadjuvantní léčby oproti adjuvantní léčbě, kdy v jejím průběhu nelze přesně zjistit její účinnost. Stejně jako u adjuvantní léčby i zde se používají antracykliny a taxany (Fischer et al. 2017).

3.5.1.4. Hormonální léčba

Tato léčba se používá u nádorů pozitivních na estrogenové nebo progesteronové receptory ("Breast Cancer: Types of Treatment" 2002). Cílem je blokáce estrogenů nebo snížení jejich obsahu (Fischer et al. 2017). Rozlišují se čtyři základní typy hormonální léčby. První ablativní, kdy dochází k vyřazení orgánu, který produkuje estrogény a to buď chirurgicky nebo medikamentózně. Druhý typ je Kompetiční, kdy dochází k degradaci estrogenových receptorů pomocí selektivních modulátorů estrogenových receptorů (SERM—tamoxifen nebo selektivních deregulátorů estrogenových receptorů (SERD – steroidní antiestrogen). SERM vazbou s estrogenovými receptory antagonistují jejich signální funkci a způsobují jejich degradaci. SERD antagonistují transkripční aktivaci estrogenových receptorů, což vede k jejich degradaci. Třetí Inhibiční metoda spočívá v podání selektivních inhibitorů aromázy (IA – anastrozol, letrozol, exemestan), které inhibují syntézu estrogenových receptorů v nádoru a periferní tkáni, čímž snižují jejich koncentraci. U postmenopauzálních pacientek dochází ke kontraindikaci, protože podání IA vede ke zvýšení hladiny gonadotropinu. Jeho zvýšená sekrece ke stimulaci vaječnicků a k sekreci estrogenů, androgenního substrátu a aromatózy. Při čtvrté Aditivní metodě dochází k blokáde vazby a redukci hormonálních receptorů vyššími dávkami hormonů progestinů a estrogenů. Mechanismus této metody je

málo objasněn a používán v případě selhání předchozích třech typů hormonální léčby, protože s sebou nese nežádoucí účinky a zhoršení kvality života (Lukešová et al. 2014)

3.5.1.5. Biologická léčba a molekulární terapie

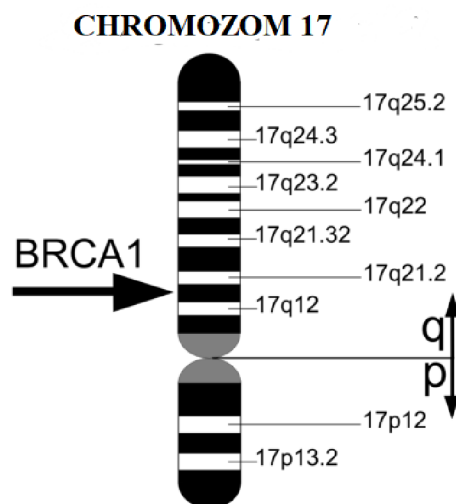
Smyslem této terapie je cíleně vyhledat a eliminovat nádorové buňky a ostatní zdravé buňky neovlivnit. Pro zavedení molekulární léčby je třeba znát kaskády nitrobuněčného přenosu signálu, identifikace cílových struktur, identifikace všech možností terapeutické intervence (Wienberg et al. 2012). V současné době se v klinické praxi používá v různých stádiích karcinomu prsu šest léků. Mezi tyto léky patří trastuzumab, pertuzumab, lapatinib, trastuzumab-emtansin, bevacizumab a everolimus (Barroso-sousa et al. 2013). Důležitým cílem biologické léčby jsou receptory pro epidermální růstové faktory – EGFR, proti kterým jsou mířeny například monoklonální protilátky trastuzumab (firemní název Hercepin), pertuzumab (firemní název Omnitag). Hercepin byl první schálenou monoklonální protilátkou k léčbě solidních nádorů. (Wienberg et al. 2012). Trastuzumab je humanizovaná rekombinantní IgG1 monoklonální protilátka, která se váže na extracelulární doménu HER2. V současné době se používá jak v adjuvantní léčbě, tak v léčbě pokročilého metastazujícího karcinomu prsu (Büchler et al. 2015). Při léčbě je vhodné ho kombinovat s taxany, pertuzumabem, inhibitory aromatáz, vinorelbinem. Vážným nežádoucím účinkem je kardiotoxicita, hematotoxicita nebo reakce na podání infuze. Další monoklonální protilátkou namířenou proti EGFR je Cetuximab (firemní název Erbitux). Cetuximab je chimérická IgG1 monoklonální protilátka (Doležalová 2015). Vazbou na receptor blokuje signální dráhy MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázy). Podmínkou účinnosti je nemutovaný stav genu *KRAS* u nádorových buněk (Klener 2013). Podává se samostatně nebo v kombinaci s irinotekanem nebo oxaliplatinou. Mezi typické nežádoucí účinky patří suchá kůže a výskyt akné v oblasti obličeje, dekoltu a zad. Mezi závažné nežádoucí účinky patří bronchospasmus, kopřivka, hypotenze se ztrátou vědomí. Tyto účinky mohou velmi vzácně vést ke smrti (Doležalová 2015). Součástí cílené terapie jsou PARP (Poly ADP ribózapolymeráza) inhibitory (Wienberg et al. 2012). PARP inhibitory blokují PARP proteiny, podílející se na opravě jednořetězcových zlomů. Zablokováním PARP proteinů dochází k hromadění jednořetězcových zlomů, které vyústí ve dvouřetězcový zlom. Při mutaci genů účastnících se opravy pomocí homologní rekombinace (HR, například *BRCA1*, *BRCA2*) dochází ke kumulaci těchto zlomů a následné apoptóze (Kiss et al. 2021) Principem PARP inhibitorů je tzv. koncept syntetické letality, ke kterému dochází díky kombinaci defektu opravy pomocí homologní rekombinace a defektu opravy jednovláknových zlomů (Vlasák et al. 2018).

4. Geny hereditárních nádorových onemocnění

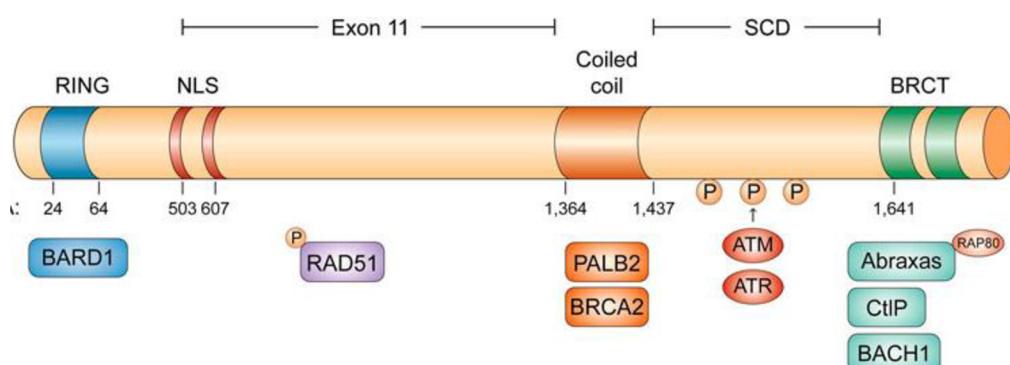
4.1. *BRCA1* (Breast cancer type 1 susceptibility protein)

4.1.1. Struktura a lokalizace

Gen *BRCA1* se nachází na 17q12-21 chromozomu, obsahuje 24 exonů a pokrývá oblast zhruba 100kb genomické DNA (Obr. 1). Kódující oblast genu zahrnuje přibližně 5,5 kb a kóduje protein o 1863 aminokyselinách. mRNA transkript má délku 8 kb. Také bylo popsáno několik přirozeně se vyskytujících variant bez celého exonu 11 nebo bez jeho části (Rosen et al. 2003). *BRCA1* zahrnuje tři základní domény, které jsou u pacientů s rakovinou velmi často mutované. Tyto tři domény se jmenují RING (exony 2-7), oblast kódovaná exonem 11 a doména BRCT (exony 16-24) (Clark et al. 2012) (Obr. 2)



Obr.1: Lokalizace genu *BRCA1* na chromozomu 17, (převzato z "File:BRCA1 en.png" Wikipedia, Kübelbeck 2001)



Obr.2: Struktura proteinu *BRCA2* s vyznačenými doménami a možnými vazebnými partnery. (převzato z "The domain structure of *BRCA1*" *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Fu et al. 2023)

4.1.1.1. Ring doména

RING doména se vyskytuje na N konci a je tvořena strukturou Cys₃-His- Cys₄ (Rosen et al. 2003). Skládá se z malého třívláknového antiparalelního β -listu a centrální šroubovice a stabilizována dvěma atomy Zn²⁺ (Clark et al. 2012). Častým vazebným partnerem pro BRCA1 je BARD1(tvoří heterokomplex BRCA1/BARD1), který obsahuje BRCT a RING doménu jako BRCA1. In vivo se kolokalizují v jaderných bodech během S-fáze buněčného cyklu a v jaderných ohniscích, která se tvoří v reakci na poškozenou DNA. Doména RING BRCA1 funguje jako ubikvitinová ligáza (E3). Je schopna polyubikvitinaci a monoubikvitinaci, díky níž může figurovat při opravě DNA (Brzovic et al. 2003).

4.1.1.2. Oblast kódovaná exonem 11

Tato oblast pokrývá více než 65 % sekvence *BRCA1* a kódují dvě jaderné lokalizační sekvence (NLS) a vazebná místa pro několik proteinů například retinoblastomového proteinu (RB), cMyc, domény vinuté spirály, která zprostředkovává interakce s PALB2 (Clark et al. 2012).

4.1.1.3. BRCT tandemová doména

Nachází se na karboxylovém (C) konci a slouží k rozpoznávání fosfopeptidů, díky tomu zprostředkovávají interakce mezi BRCA1 a proteiny fosforylovanými ATM a ATR proteinkinázami. BRCT se skládá ze tří α -šroubovic a čtyř vláken β -listu. Dělí se na dvě třídy na základě schopnosti rozeznávat fosfoproteiny. Domény I.třídy rozeznávají fosfoserinové zbytky (pSer). Domény II.třídy rozeznávají fosfotreoninové (pThr) zbytky (Takaoka et al. 2018). Na tyto fosforylace se spoléhají signalizační kaskády, při reakci na poškození DNA. Díky tomu domény BRCT přímo detekují poškozenou DNA. Dále se BRCT domény podílejí na interakcích s proteiny nazávislými na fosforylaci, vazbě DNA a vazbě poly (ADP-ribózy) (Ching Yun Leung et al.2011).

4.1.2. Funkce

4.1.2.1. Oprava poškozené DNA

K opravě dvouřetězcových zlomů (DSB) využívá BRCA1 dva mechanismy-nehomologní spojování konců (NHEJ) a homologní rekombinace (HR). NHEJ funguje v buňkách většinou v G₀ a G₁ fázi. Tento mechanismus není u BRCA1 moc jasný, ale v některých studiích se uvádí, že BRCA1 interaguje s proteinem Ku80 (klíčový protein pro NHEJ) a váží se v místech DSB. Mechanismus homologní rekombinace (HR) využívá k opravě DSB sesterské chromatidy jako templáty. Nejprve se místa DSB resekují, čímž se vytvoří 3 jednořetězcové DNA (ssDNA). Ty se naváží na replikační protein A (RPA), který je poté zaměněn za Rad51. Rad51 usnadňuje invazi sesterského řetězce, to vede k vytvoření Holliday spojení a následné

opravě DSB. (Sharma et al. 2018). V tomto mechanismu hrají důležitou roli tři komplexy BRCA1 s několika partnerskými proteiny – fosforylované abraxy (např. FAM175A, ABRA1 nebo CCDC98), CtBP-interacting protein (CtIP; známý také jako RBBP8) a karboxyl-terminální helikáza (BACH1; známá také jako FANCI a BRIP1) (Takaoka et al.2018). Podle závislosti na těchto proteinech tvoří doména BRCA1 čtyři různé komplexy – A, B, C a D.

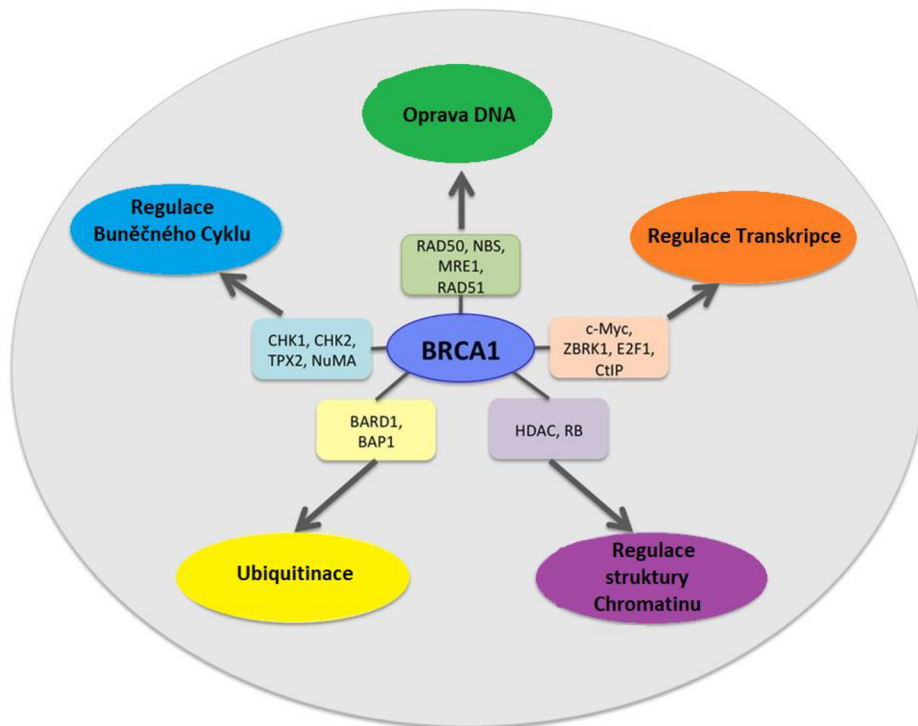
4.1.2.2. Regulace kontrolních bodů buněčného cyklu

BRCA1 vyvolává zastavení buněčného cyklu v několika jeho fázích, což zřejmě doplňuje jeho úlohu v procesech opravy DNA a poskytuje na ně dostatek času (Mullan et al. 2006). Kontrolní bod G1/S vyžaduje fosforylaci BRCA1 pomocí ATM nebo ATR, což usnadňuje fosforylaci p53 na S15(Serin15). Fosforylace p53-S15 je nezbytná pro transkripční proces pro indukci cyklin dependentní kinázy (CDK) inhibitoru p21 a aktivaci kontrolního bodu G1/S vyvolanou ionizujícím zářením (Roy et al. 2011). Vznik komplexu BRCA1-BACH1 s TOPBP1(DNA topoisomerase 2-binding protein1) je nutný pro kontrolní body replikace během S fáze buněčného cyklu a lze jej během S fáze okamžitě detekovat, což naznačuje, že pravděpodobně funguje při replikaci DNA (Takaoka et al.2018). BRCA1 je spojena s regulací G2/M kontrolního bodu, tím že transkripčně potlačuje cyklinB odpovědný za aktivaci cdc2 kinázy a vstupu do mitózy. BRCA1 Také transkripčně reguluje chaperonový protein 14-3-3 σ , který po poškození DNA jej uvolňuje v cytoplazmě dc25C fosfatázu, aby zabránil aktivaci komplexu cyklinB-cdc2 kinázy. Tím inhibuje transkripci PLK1 kinázy (polo-like kinase 1) potřebné pro přechod z G2 do M. K zástavě buněčného cyklu v bodě G2/M pomocí BRCA1 dochází přes regulaci GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45), regulaci komplexu CyclinB-cdc2, což vede k inhibici kinázy cdc2. BRCA1 může regulovat mitotický kontrolní bod regulací transkripce MAD2 proteinu (Mitotic spindle checkpoint component MAD2), klíčové součásti kontrolního bodu sestavení mitotického vřeténka. (Mullan et al. 2006)

4.1.2.3. Transkripční funkce

BRCA1 modeluje genovou expresi na úrovni transkripce díky tvorbě komplexů s BRCT, které mohou aktivovat transkripci RNA spojením s heterologní DNA vazebnou doménou (Obr. 3). Spojením polypeptidy BRCA1 holoenzymem RNA polymerázy II a některými transkripčními faktory může podporovat transkripci některých reportérových genů (Takaoka et al.2018). Úloha BRCA1 v regulaci transkripce není známa a může být proměnlivá – může docházet jak k její aktivaci tak k potlačení. K aktivaci transkripce dochází u fosforylace BRCA1 mutací ATM, k potlačení transkripce u c-Myc. BRCA1 ovlivňuje estrogení signální dráhu navázáním

Na estrogenový receptor $E\alpha$, kde potlačuje expresi mnoha endogenních genů např. *VEGF*, který je klíčový pro růst nádoru (Sharma et al. 2018).



Obr.3: Schéma funkcí proteinu BRCA1. (převzato z “BRCA1 is at the hub of numerous interconnecting cellular pathways” Frontiers in Oncology, Mylavaram et al. 2023)

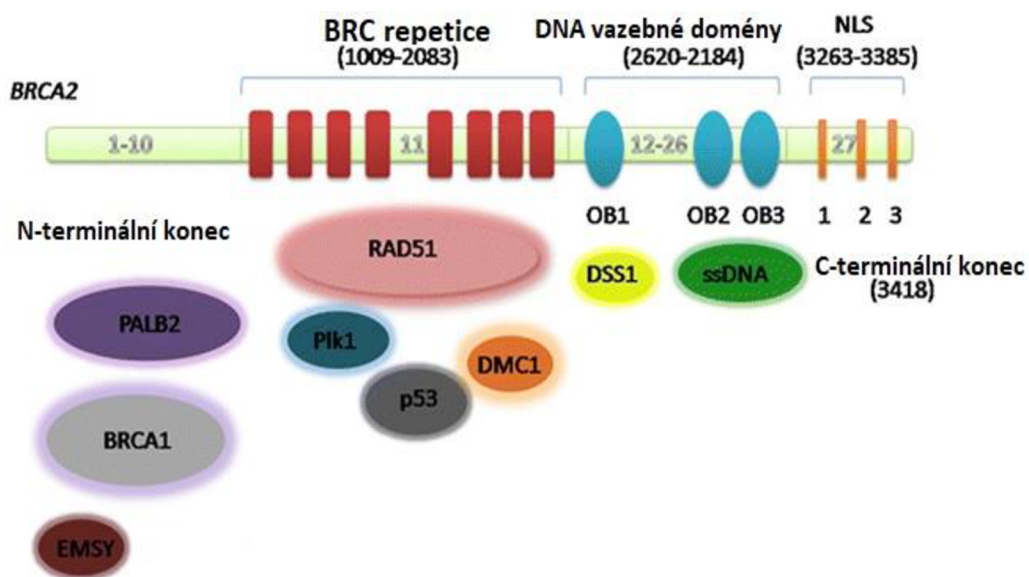
4.1.1. Mutace

Riziko rakoviny prsu je spojeno s umístěním mutace (Takaoka et al.2018). Zárdečné mutace v *BRCA1* u karcinomu prsu korelují s nádorovou proliferací. Mutace v N- nebo C-konci jsou široce spojovány s vysokou mírou nádorové proliferace. Mutace v centrální oblasti korelují s nižší mírou (Hesketh 1997). Například mutace v doméně RING (C61G) snižuje jak E3 ligázovou aktivitu, tak vazbu na BARD1. Mutace ovlivňující doménu BRCT narušují jeho nábor do DSBs a funkci opravy DNA zprostředkované HR a mohly by snižovat její nádorově supresivní účinek. Missense mutace v této oblasti jsou často pozorovány u časných stadií karcinomu prsu (Takaoka et al.2018). Dále jakákoli mutace v CtIP, zejména na *C-konci* genu, vede k nestabilitě genomu a podílí na predispozici ke vzniku nádorového onemocnění (Sharma et al. 2018). Většina mutací *BRCA1* jsou posuvné (frame-shift) mutace, které vedou k posunu čtecího rámce a následnému zkrácení proteinů BRCA1, ale vyskytují se i bodové mutace v C-terminální doméně nebo N-doméně (Rosen et al. 2003)

4.2. BRCA2 (Breast cancer type 2 susceptibility protein)

4.2.1. Struktura a lokalizace

Gen *BRCA2* se nachází 13. chromozomu konkrétněji 13q12 (Hesketh et al 1997). Obsahuje 27 exonů a kóduje protein o 3418 aminokyselinách (Shailani, et al 2018) (Obr. 4). N-koncová oblast *BRCA2* obsahuje dvě místa pro interakci s proteiny PALB2 a EMSY (z angl. BRCA2-interacting transcriptional repressor EMSY), vazebné místo pro DNA a předpokládá se, že je vnitřně neuspořádaná. Centrální doména *BRCA2* obsahuje osm BRC repetitivních kódovaných exonem 11, které pokrývají téměř třetinu proteinu a tvoří primární interakční místa RAD51. BRC domény se dělí do dvou kategorií-BRC1-4, které vážou volný RAD51 a stimulují tvorbu komplexů RAD51-ssDNA a zabraňuje vazbě RAD51 na dsDNA. Domény BRC5-8 stabilizují nukleoproteinová vlákna RAD51-ssDNA (Phuong Le et al. 2012). BRC repetitivní se skládají z přibližně 1000 aminokyselin. C-konec *BRCA2* obsahuje tři domény obsahující přibližně 110 aminokyselin OB1, OB2 a OB3 a vykazují podobnost s doménami oligonukleotidové/oligosacharidové vazby (OB). OB domény zajišťují vysokou afinitu C-



Obr. 4: Schéma struktury proteinu BRCA2 s možnými vazebnými partnery. (převzato z “Struktura BRCA2 a její motivy pro interakci s různými proteiny” Research gate, Shailani et al. 2023)

konec *BRCA2* k jedno a dvouřetězcové DNA (Shailani et al. 2018) jejich vazebná oblast je tvořena pětivláknovým β listem (tvoří β soudek) s dvojicí smyček. V OB2 je smyčka nahrazena 130 aminokyselinovou vložkou tvořící věžovou doménu (TD) (Shampoo 2003). C-konec obsahuje dva jaderné lokalizační signály (NLS) a další interakční místo AD51 (TR2),

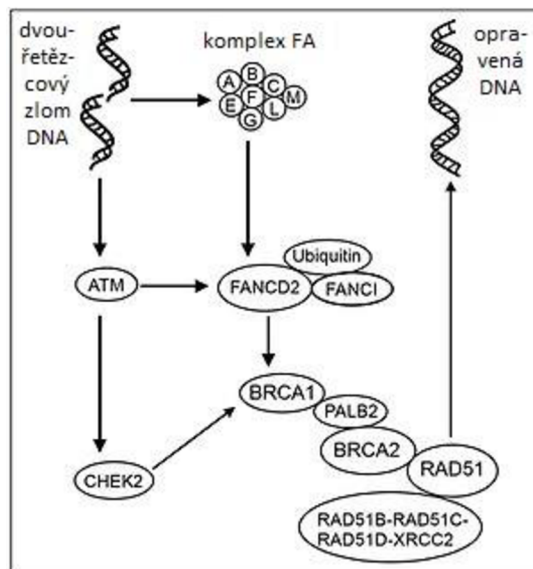
které se specificky váže na vlákna RAD51 (Phuong Le et al. 2012), a-helikální doménu (Roy et al. 2011)

4.2.2. Funkce

BRCA2 se podílí na klíčových procesech pro udržení stability genomu, včetně replikace DNA, homeostázy telomer a progresu buněčného cyklu. Podle současného modelu je BRCA2 ústředním regulátorem stability genomu tím, že opravuje DSB a omezuje replikační stres (Fradet-turcotte et al. 2016).

4.2.2.1. Úloha BRCA2 v homologní opravě

Proces je zprostředkován tvorbou RAD51 nukleoproteinového vlákna na jednořetězcové DNA. RAD51 se váže na BRC doménu (Obr. 5). RAD51 reaguje se dvěma kategoriemi BRC. První kategorie snižuje hydrolýzu ATP u RAD51, čímž vzniká nukleoproteinové vlákno. Druhá pomáhá při prevenci nukleace dvouvláknové DNA pomocí RAD5 (Shailani et al. 2018). Tvorba nukleoproteinového vlákna RAD51 na ssDNA umožní hledání homologů, invazi do řetězce DNA a následnou opravu DSB. BRCA2 se může spojovat s proteinem EMSY, což hraje roli v remodelaci chromatinu, a s PALB2 (Fradet-turcotte et al. 2016). PALB2 usnadňuje vznik homologní rekombinace a zprostředkovává vazbu BRCA1 a BRCA2 (Shailani et al. 2018).



Obr.5: Schéma opravy DSB pomocí homologní rekombinace s jednotlivými kroky. (převzato z "Recombinational repair of DNA double-strand damage - some key steps" Wikipedie, chaya5260 2001)

4.2.2.2. Ochrana replikační vidličky

BRCA2 chrání zastavené replikační vidlice před nukleolytickou degradací. K zastavení může dojít díky dlouhodobému replikačnímu stresu, při špatném restartu zastavené vidličky mohou

vznikat DSB, při naražení na překážku mohou vznikat tzv. ICL (Interstrand DNA crosslinks- mezivláknové příčné vazby DNA) tyto překážky představují nebezpečí u pacientů s Fanconiho syndromem. *BRCA2* byl klasifikován jako gen podobný *FA* (fanconiho syndrom) genu (Fradet-turcotte et al. 2016).

4.2.2.3. Regulace buněčného cyklu

Během telofáze a cytokineze se *BRCA2* nachází na centrálním vřetenku a středním tělese. Některé studie zjistily, že inaktivace nebo deplece *BRCA2* vede k amplifikaci centrozomů, následnému nerovnoměrnému oddělení chromozomů. Při přechodu z G2 fáze do M fáze *BRCA2* interaguje s proteinem HMG20b, což je kinezinu podobný svinutý protein, narušení této interakce vede k defektům v dokončení buněčného dělení a potlačení *BRCA2* vede ke zpoždění přechodu. *BRCA2* interaguje se serin/threoninovou kinázou Auroro-A a Aurora-B. interakce s Aurorou-A působí synergicky a regulují segregaci chromozomů. Knockout Aurory-B vede k abnormálnímu buněčnému dělení a polyploidii (Shailani et al. 2018).

4.2.3. Mutace

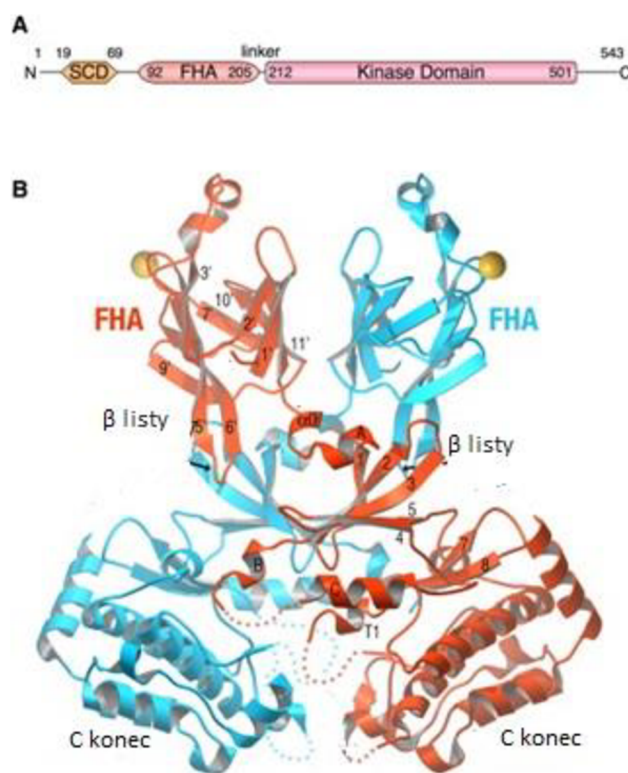
V genu *BRCA2* bylo zaznamenáno přibližně 2000 mutací (Shailani et al. 2018). Mutace spojené s rakovinou jsou rozloženy po celém exonu 11, v meziprostorech mezi repeticemi *BRC* (Pellegrine et al. 2004). Mutace zahrnují inserce nebo delece, které zvyšují předčasné zakončení stop kodonu a missense změny v genu. Důsledkem missense mutací jsou Neznámé klasifikované varianty-UCV. Ty představují přibližně 50% všech mutací v *BRCA2* (Shailani et al. 2018). Kromě toho jsou bialelické mutace v *BRCA2* spojeny s *FA* (Fanconiho syndrom), vzácným syndromem nestability chromozomů, který se vyznačuje aplastickou anémií u dětí a náchylností k leukémii a rakovině (Fradet-turcotte et al. 2016).

4.3. *CHEK2*

4.3.1. Struktura a lokalizace

CHEK2 (checkpoint kinase 2) je nádorový supresorový gen, kódující serin-treonin kinázu *CHK2* (Germani et al. 2022). Je lokalizován na chromozom 22q12.1 a skládá se z 54 kb. Nejvíce exprimovaná transkripční varianta kóduje mRNA sestávající z 15 exonů (Stolarova et al. 2020). Serin-treoninová kináza *CHK2* (*CHEK2*) má velikost 65 kDa a skládá se z 543 aminokyselin (Germani et al. 2022). Obsahuje tři funkční domény. Na N-konci SCD (cluster domains – SQ/TQ) tvořené sedmi páry serin-glutaminových nebo threonin-glutaminových zbytků fosforylovaných ATM a dalšími knázami (Obr. 6A). Doména obsahuje zbytek T68, jejíž fosforylací dochází k aktivaci proteinu a je tvořena 19-69 aminokyselinou (Stolarova et

al. 2020). Centrální část proteinu obsahuje FHA (forkhead). FHA je interakční doména protein-protein, váže se zde peptidová vazba obsahující fosfo-threonin a je tvořena 92-205 aminokyselinou. Skládá se z jedenácti řetězcového β listu s vazebným místem pro fosfotreonin na jednom konci a prodlouženou vlásenkou na druhém konci. Prodloužená vlásenka obsahuje Ile157, který je mutovaný u Li-Fraumeniho syndromu a intermolekulárně reaguje s kinázovou doménou na N-konce druhého proteinu. (Cai et al. 2009). C-konec je tvořen kinázovými doménami (KD) a obsahuje jaderný lokalizační signál (NLS) (Germani et al. 2022). Skládá se ze dvou laloků. (Stolarova et al. 2020). N-terminální lalok se skládá z β listů (zbytky 213-305). C-konec obsahuje převážně α -helixy (zbytky 306-501). Štěrbina mezi nimi tvoří vazebné místo pro ATP (Obr. 6B).



Obr.6: A – schéma struktury proteinu CHK2, B - struktura homodimeru CHK2. (převzato z “Structure of the CHK2K249R Dimer” Molecular Cell, Cai et al. 2023)

4.3.2. Funkce

4.3.2.1. Aktivace

Klíčovým úkolem CHK2 je přenos kontrolních signálů z proximálních kontrolních kináz zejména ATM a ATR, které jej fosforylují a aktivují (Obr. 7). CHK2 je stabilní protein exprimovaný v průběhu celého buněčného cyklu. V nepřítomnosti poškození DNA je do značné míry neaktivní (Bartek and Lukas 2003) a vyskytuje se jako monomer. Po poškození DNA jsou její signály přenášeny na ATM kinázu. ATM kináza fosforyluje CHK2, to vede k

dimerizaci CHK2. Při fosforylaci se oblast s fosforylovaným Thr68 v jedné molekule CHK2 váže na FHA doménu druhé molekuly. Po dimerizaci nejspíše následuje několik mezimolekulárních fosforylací, které vedou k aktivaci CHK2 (Ahn et al. 2004). Aktivovaná kináza CHK2 se pak podílí na regulaci mnoha intracelulárních drah (Stolarova et al. 2020)

4.3.3. Mutace

Mutace *CHEK2* patří k nejčastějším zárodečným změnám odhaleným při genetickém testování různých dědičných predispozic k rakovině. Rutinní genetické testování *CHEK2* je nyní součástí diagnostických NGS panelů (Stolarova et al. 2020). Funkční dopad mutace *CHEK2* odráží její umístění. Mutace kinázové domény tak vedou k chybné aktivaci kinázy po ionizujícím záření, zatímco léze domény FHA mohou urychlit degradaci CHK2 nebo mohou vyvolat strukturální změny, které způsobují defekty při tvorbě homodimerů (Ahn et al. 2004).

4.4. *PALB2* (z angl. Partner and localizer of BRCA2)

4.4.1. Struktura a lokalizace

Gen *PALB2* se nachází na chromozomu 16p12.2 a obsahuje 13 exonů (Ducy et al. 2019). Kóduje protein o velikosti 130kDa (Southey et al. 2013) a 1186 aminokyselin se třemi



Obr.8: Schéma struktury proteinu PALB2. (převzato a upraveno z “Human PALB2 variants and their effect on HR” Nature Communications, Boonem et al. 2023)

klíčovými doménami (Hamdan et al. 2023) (Obr. 8). Na N-konci je umístěna Coiled-coil (CC) doména, která interaguje s BRCA1 a tvoří komplex BRCA1-PALB2 při homologní opravě (Ducy et al. 2019). Coiled-coil se obvykle skládá z 2-5 levotočivých α -šroubovic v superzávitové struktuře (Nepomuceno et al. 2017). Na C-konci se nachází doména WD40 interagující s BRCA2 a DNA polymerázou (Hamdan et al. 2023). WD doména je charakterizována jako β -vrtule (β -propeller) složená ze sedmi opakování o 40 až 60 aminokyselinových zbytků s charakteristickým dipeptidem. Prostřednictvím této domény interaguje PALB2 s BRCA2, konkrétněji vytváří kapsu mezi čtvrtou a pátou repeticí. Dále bylo prokázáno, že WD doména obsahuje jaderný exportní signál (NES) (Nepomuceno et al. 2017). Třetí doména se nachází ve střední části a nazývá se chromatin asociační motiv (ChAM) (Hamdan et al. 2023). Zprostředkovává chromatinovou asociaci mezi PALB2 a nukleozomálními histony v porušených i neporušených buňkách (Ducy et al. 2019).

4.4.2. Funkce

PALB2 slouží jako spojovací článek mezi proteiny BRCA1 a BRCA2 s nimiž se podílí na opravách dvouřetězcových zlomů DNA (DSB) pomocí homologní rekombinace (HR) (Janotová et al. 2016). PALB2 reaguje s BRCA1 v coiled-coil doméně (vinutých cívkách) a C-koncem s N-koncem BRCA2. Následně zacílí PALB2 a BRCA2 na místa poškození DNA. (Zhang et al. 2009). Homologní rekombinace je řízena kinázami ATM a ATR. ATM je aktivována komplexem MRN (MRN complex interacting protein). Během opravy DSB stimuluje ATM proces nazývaný resekce 5' konce DNA, který obnáší ssDNA (single-stranded DNA), což spustí ATR. Resekce konce DNA je iniciována komplexem MRN a později zpracovávána C-terminálním vazebným proteinem (CtBP) interagujícím s proteinem (CtIP), exonukleázou 1 (Exo1) a DNA2. Po uzavření ssDNA pomocí RPA (replikační protein A) rekrutuje BRCA1 BRCA2 a RAD51 prostřednictvím interakce zprostředkované vinutou spirálou s PALB2 (Nepomuceno et al. 2017).

4.4.3. Mutace

Heterozygotní zárodečné mutace v *PALB2* se podílejí na vzniku rakoviny prsu, slinivky břišní a vaječnicků. Bialelické mutace *PALB2* byly spojeny s Fanconiho anémií (FA). Nyní je známo 604 různých variant *PALB2*, ale pouze 140 variant je patogenních a přibližně 400 z nich jsou varianty neznámého významu (VUS) (Hamdan et al. 2023).

5. Molekulární diagnostika nádorových syndromů

Molekulární diagnostika je součástí laboratorní medicíny, která se opírá o detekci jednotlivých biologických molekul, obvykle se používá pro testy založené na DNA, RNA a některých moderních sofistikovaných proteomických technologiích. Molekulární testy se staly součástí identifikace dědičných nádorů. Dále pomáhají vybrat nejúčinnější léčbu na základě molekulárních charakteristik nádorových tkání nebo některých dalších biologických parametrů maligního onemocnění (Sokolenko et al. 2018)

5.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce- PCR je metoda umožňující ze směsi DNA namnožit žádané sekvence. PCR probíhá v termocykleru a skládá se ze tří kroků. (Otová et al. 2021). Prvním krokem je denaturace, kdy se dvouřetězcová DNA rozdělí na dvě jednořetězcové DNA za vysokých teplot (90-97°C). Jednořetězcové molekuly DNA slouží v dalších krocích jako templát (Mohini Joshi et al. 2011). Při druhém kroku, hybridizaci, dochází k připojování specifických primerů na cílovou oblast DNA. Tato reakce probíhá při teplotě 50-65°C. Při třetím kroku, elongaci, dochází k tvorbě kopií DNA pomocí *Taq* DNA polymerázy

(termostabilní DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* YTI). Teplotní optimum *Taq* DNA polymerázy je 72°C. Tyto tři kroky se opakují v 30 až 40 cyklem (Beránek 2016). Po posledním cyklu se vzorky obvykle inkubují při teplotě 72 °C po dobu 5 minut, aby se aby se vyplnily vyčnívající konce nově syntetizovaných produktů PCR (Mohini Joshi et al. 2011). Techniky založené na PCR vyžadují relativně jednoduché přístrojové vybavení a infrastrukturu, využívají pouze nepatrné množství biologického materiálu a jsou vysoce kompatibilní s klinickou rutinou (Sokolenko et al. 2018).

5.1.1. Real-time PCR

V klasické PCR je amplifikovaný produkt (amplikon) detekován po skončení reakce elektroforeticky. Real-time PCR umožňuje měření zmnoženého produktu v průběhu reakce, tzn. v reálném čase (real time) (Dudová et al. 2008). K měření se používají různá fluorescenční barviva, která reagují s amplifikovaným produktem a mohou být měřena pomocí přístroje (Mohini Joshi et al. 2011). Hledaná sekvence DNA může být stanovena jak kvalitativně, tak i kvantitativně (počet kopií DNA), proto je real-time PCR označována také jako kvantitativní PCR (qPCR). (Dudová et al. 2008).

5.1.2. Reverzně – transkriptázová PCR (RT-PCR)

Tato metoda se používá za předpokladu, je-li výchozím materiálem RNA. Při RT-qPCR je nejprve RNA přepsána do komplementární DNA reverzní transkriptázou (cDNA. cDNA se následně využije jako templát pro PCR (“Polymerázová řetězová reakce” 2023). Tato metoda může být využita pro amplifikaci RNA charakteristických pro epiteliální buňky prsu ve vzorku krve, které by neměly cirkulovat v periferní krvi zdravých jedinců. Detekce charakteristické mRNA ukazuje na přítomnost cirkulujících buněk karcinomu prsu (Aerts et al. 2001).

5.2. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

MLPA je multiplexní test založený na principu PCR reakce (Stuppia et al. 2012). Využívá se pro detekci delecí o velikosti několika párů bází nebo velmi velkých delecí (Sellner et al. 2004). Tato analýza využívá až 40 různých sond, z nichž každá je specifická pro jinou sekvenci DNA (Stuppia et al. 2012). Každá sonda se skládá ze dvou polovin. Jedna polovina se skládá z cílově specifické sekvence lemovanou sekvencí univerzálních primerů. Druhá polovina se skládá ze specifických primerů na jednom konci, náhodného primeru o velikosti mezi 19-137 nukleotidy univerzální primerovou sekvencí na druhém konci (Sellner et al. 2004). Reakce MLPA probíhá pěti kroky: 1) denaturace DNA a hybridizace sond, kdy dochází k denaturaci DNA a inkubaci se směsí sond MLPA. 2) ligační reakce, zde jsou dvě poloviční sondy jsou schopny rozpoznat sousedící cílové specifické sekvence a pouze v případě

dokonalé shody bez jediné mezery lze po hybridizaci obě poloviční sondy spojit a amplifikovat. 3) amplifikace PCR, která se provádí pouze pomocí jednoho páru primerů PCR, z nichž jeden je fluorescenčně značený. 4) separace amplifikačních produktů, kdy se produkty PCR rozdělí podle velikosti pomocí kapilární elektroforézy za denaturačních podmínek. Měří se výška nebo plocha fluorescenčních píků odvozených z PCR, kvantifikuje se množství produktu PCR po normalizaci a porovnává se s kontrolními vzorky DNA, čímž se určí relativní množství cílové sekvence DNA ve vstupním vzorku DNA. 5) analýza dat, kdy se při interpretaci výsledků liší specifické píky při delecích nebo duplikacích pro homozygoty a heterozygoty. MLPA se využívá pro detekci delecí nebo duplikací při analýze genomových přestaveb u *BRCA1* a *BRCA2* (Stuppia et al. 2012).

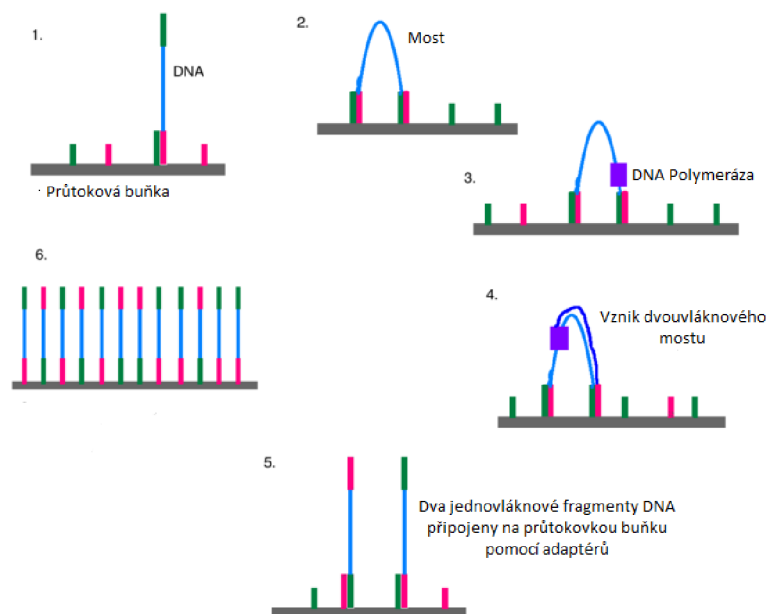
5.3. Sekvenování nové generace (NGS)

Sekvenování nové generace (NGS), masivně paralelní nebo hloubkové sekvenování jsou příbuzné pojmy označující technologii sekvenování DNA, která způsobila revoluci v genomickém výzkumu. Existuje řada různých NGS platforem, které využívají různé sekvenovací technologie. Všechny platformy NGS provádějí sekvenování milionů malých fragmentů DNA paralelně. NGS lze použít k sekvenování celých genomů nebo se omezit na konkrétní oblasti zájmu (Behjati et al. 2013). Technologie NGS umožňuje sekvenovat tři základní typy genomových variant –jednonukleotidové záměny (single nucleotide variant SNV), variabilita v počtu kopií genů (copy number variant.CNV) a krátké inserce a delece (indels) – lze identifikovat na úrovni nádorové DNA, fúzní geny jsou detekovány pomocí analýzy nádorové RNA, protože na jednu kopii fúzního genu připadají stovky až tisíce transkriptů RNA, což vede k vyšší citlivosti. Nicméně je potřeba provést přepis (reverzní transkripci) nádorové RNA do cDNA (Slabý 2019).

5.3.1. Průběh NGS

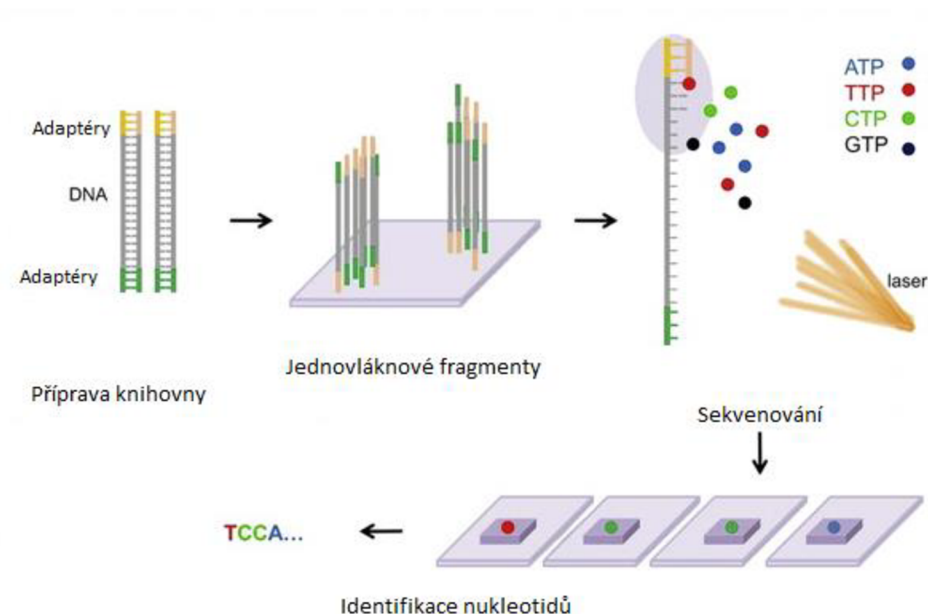
Technologie NGS sdílejí obecné kroky zpracování ale zároveň se liší ve specifických technických detailech. Prvním společným krokem v této metodě je příprava knihovny, která obsahuje náhodně se překrývající fragmenty DNA navázané na oligonukleotidové adaptéry specifické pro danou platformu (Voelkerding et al. 2010). Pro tvorbu fragmentů lze použít nejen vzorky DNA a RNA získané z mnoha buněk, ale také amplifikační produkty genomu (Desmedt et al. 2012), které se podrobí enzymatickému štěpení nebo sonifikaci nebo nebulizaci (Voelkerding et al. 2010). Optimální podmínky fragmentace musí být stanoveny empiricky na základě velikosti vstupní molekuly a požadovaného rozdělení velikosti fragmentů, kdy se upřednostňuje těsnější zastoupení, aby se maximalizovalo zastoupení

sekvencí v knihovně. Po opravě tupých konců terminálních částí fragmentů fosforylací následuje purifikace pomocí kolonky nebo magnetických kuliček. V některých případech se provádí monoadenylace 3' konců, což zvyšuje ligaci na oligonukleotidové adaptéry. Dalším krokem je amplifikace knihovny. Tato část se liší podle druhu sekvenátoru (Voelkerding et al. 2010). Na trhu dominují tři sekvenátory: Roche 454 Genom Seguece, Illumina Genom Analyzer a Life Technologies SOLiD System. Technologie Roche 454 Genom Seguece využívá klonální amplifikaci pomocí emulzní PCR (emPCR), kdy jsou v předchozím kroku fragmenty hybridizovány ke speciálním DNA kuličkám s komplementární DNA sekvencí na povrchu, která slouží jako primer pro amplifikaci. Amplifikace jednoho fragmentu probíhá v olejovo- vodném obalu kuličky - mikroreaktoru. Po skončení emPCR jsou kuličky uvolněny z obalu, přičemž každá nese v průměru 10 miliónů identických kopií původní DNA. Poté následuje obohacení (enrichment), kdy se odmyje vše kromě kuličky s amplifikovanou DNA. Na takto připravené kuličky jsou přichyceny sekvenační primery a přeneseny do tzv. pikotitrační destičky která obsahuje jamky. Kuličky s amplifikovanou DNA a sekvenačními primery jsou přeneseny do jamky tak, aby do jedné jamky zapadla pouze jedna kulička (Vojtěšek et al. 2014). U technologie Illumina jsou jednotlivé molekuly fragmentů vázané na povrchu průtokové buňky pomocí dvou druhů adaptérů, které se nachází jak na fragmentech, tak i na povrchu průtokové komůrky (Obr. 9). Pomocí adaptérů dojde k napojení fragmentů na adaptéry nacházející se na povrchu průtokové buňky. Po napojení dochází k amplifikaci komplementárního vlákna DNA pomocí DNA polymerázy. Následuje denaturace, kdy dojde k rozdělení vláken, původní vlákno je odmyto, nově nasyntetizované zůstává připojeno přes adaptéry k průtokové komůrce a dochází k ohybu jeho volného konce a připojení k dalšímu adaptéru na povrchu průtokové komůrky, což vede k tvorbě. V druhém cyklu PCR dojde opět k prodloužení adaptoru polymerázou a tvorbě dvouvláknového mostu (Vojtěšek, Kubková, and Vyzula 2014). Poté dochází ke klonální amplifikaci, kdy jsou dvouvláknové mosty denaturovány a vznikají jednovláknové fragmenty navázané na průtokovou buňku pomocí adaptérů.



Obr.9: Tvorba dvouvláknového mostu před samotnou sekvenací v přístroji Illumina MiSeq, (převzato a upraveno z “Cluster_Generation” Wikipedia, DMLapato 2023)

Life Technologies/SOLiD využívá pro přípravu knihovny emPCR stejně jako Roche 454 Genom Sequence. Navíc se k fragmentům DNA připojují krátké adaptory, které zajišťují vazbu na imobilizované adaptory na povrchu kuličky. Po amplifikaci jsou kuličky kovalentně navázány na sklíčko se speciálně upraveným povrchem, které se vloží do kazety umožňující fluidní průtok. Po kroku amplifikace následuje sekvenování. Sekvenování se opět liší podle typu sekvnátoru. U Roche 454 Genom Sequence probíhá pyrosekvenování se dATP, dCTP, dGTP nebo dTTP a polymerázou postupným přeléváním přes pikotitrovou destičku s kuličkám s komplementární DNA sekvencí na povrchu. Dochází k inkorporaci komplementárních nukleotidů na rostoucím vlákně v jednotlivých jamkách, uvolnění pyrofosfátu, který reaguje s luciferázou za vzniku luminiscence. Luminiscence je zachycena CCD kamerou a je přímo úměrná počtu nukleotidů (Voelkerding et al. 2010). Sekvenační primery u Illumina Genome Analyzer jsou hybridizovány k adaptorovým sekvencím a do reakční komůrky s klastry je přidána směs polymerázy a čtyř nukleotidů s chemicky inaktivovanou 3'-OH skupinou a čtyřmi rozdílnými fluorescenčními sondami (Obr. 10). V jednom cyklu dochází k začlenění pouze jednoho nukleotidu. Jakmile dojde k začlenění nukleotidu do řetězce DNA, pozice a typ nukleotidu jsou zaznamenány díky jeho fluorescenční značce pomocí CCD kamery. Terminační skupina na 3'-konci nukleotidu i fluorescenční sondy jsou odstraněny a cyklus je opakován.



Obr.10.: Zjednodušené schéma sekvenování pomocí Illumina MiSeq, (převzato a upraveno z “Illumina sequencing” ScienceDirect, Zhou et al. 2023).

Při sekvenování u Life Technologies/SOLiD se využívají 8 nukleotidů dlouhé sondy se známou sekvencí prvních dvou bází a jsou označena jednou ze čtyř různých fluorescenčních barev, přičemž každá barva představuje 4 z 16 možných di-nukleotidových sekvencí. Solid technologie zaručuje přečtení každého nukleotidu 2krát, což zvyšuje přesnost, s jakou je určeno pořadí nukleotidů dané sekvence (Vojtěšek et al. 2014). Po sekvenování následuje bioinformatická analýza (Obr. 11). V první fázi této analýzy jsou získané sekvence přiřazovány (alignment) k referenčnímu genomu či sekvenci považované za sekvenci referenční. Následně se hledají varianty v sekvenovaném vzorku DNA (variant calling), poté dochází k anotaci nalezených variant a dále se filtrují. Zde jsou postupně eliminovány varianty podle různých kritérií, v první fázi automaticky (například dle schopnosti varianty měnit strukturu kódovaného proteinu, tzv. nesynonymní varianty) a následně manuálně (například filtrování podle klinické evidence). Cílem je zúžit seznam nalezených variant (Slabý 2008).

5.3.2. Hloubka pokrytí

Hloubka pokrytí – coverage vypovídá o průměrném počtu kopií vzorku DNA, které se získají sekvenováním. Větší pokrytí zajišťuje eliminaci chyb přístrojů a zvyšuje citlivost metod. V praxi nebývá hloubka pokrytí rovnoměrná. Například při průměrném pokrytí 30krát budou pravděpodobně stále existovat úseky, o nichž nebudeme mít žádné nebo téměř žádné informace, sekvence jiných oblastí bude naopak obsažena ve stovkách čtení (tzv. readů). Tato

nevyváženost může být způsobena například rozdílnou mírou amplifikace pomocí PCR, rozdíly v účinnosti hybridizačních sond při cíleném sekvenování či vlivy repetitivních oblastí (Vojtěšek et al. 2015).

5.3.3. Celogenomové sekvenování (whole genome sequencing, WGS)

Umožňuje detekovat všechny typy variant napříč celým genomem, v kódujících (tzv. exom) i nekódujících oblastech, a tak umožňuje identifikovat i nové, dříve nepopsané nádorové varianty (Slabý 2008). Využívá metody de novo sekvenování resekvenování, kdy je k dispozici referenční sekvence na kterou se zpětně mapuje nová sekvence. Toto sekvenování se nejvíce používá k identifikaci nových a vzácně se vyskytujících mutací (Vojtěšek et al. 2014).

5.3.4. Celoexomové sekvenování –whole exome sequencing , WES)

Tato metoda pokrývá pouze kódující oblasti genomu, tedy přibližně 1 % z jeho celkové sekvence. Nicméně v této oblasti se vyskytuje přibližně 85 % patogenních variant. Nižší šíře pokrytí WES umožňuje oproti WGS větší hloubku čtení, a tak i vyšší senzitivitu pro záchyt variant v heterogenním vzorku nádorové tkáně (Slabý 2008). Pomocí WES byly odhaleny mutace zodpovědné za familiární nádory pankreatu nebo melanomu (Vojtěšek et al. 2014).

5.3.5. Cílené sekvenování – hotspot sekvenování

Cílené sekvenování umožňuje sekvenovat pouze vybrané geny nebo definované oblasti genomu, což šetří čas, peníze a vyžaduje i méně prostoru pro skladování dat. Typicky se tato technika využívá pro sekvenování velkého počtu vzorků při screeningu nebo validaci genetických variant v populaci (Vojtěšek et al. 2014). Lze tak detekovat somatické mutace v komplexním biologickém vzorku, jakým je vzorek nádoru obsahující směs zdravých a nádorových buněk. Citlivost této metody umožňuje detekovat mutace s frekvencí četnosti pod 1 % (Vojtěšek et al. 2015).

5.3.6. Panelové sekvenování

V praxi se však nejvíce využívá panelové sekvenování, při kterém dochází k vychytávání cílových oblastí z fragmentované DNA pomocí hybridizačních sond tzv. sequence capture nebo sequence enrichment (Kleibl 2016). Panelové sekvenování slouží k analýze většího množství nádorových predispozičních genů najednou (Soukupová 2016). Také umožňuje selektivní vychytávání velkého počtu cílových oblastí (např. exonů stovek genů) až do celkové velikosti exomu ($> 20\ 000$ genů s $>10^7$ bp genetické informace) (Kleibl 2016). Panely používané pro analýzu nádorových predispozičních genů se v jednotlivých diagnostických laboratořích liší, používány jsou jednak komerčně dostupné panely nebo v laboratoři

vytvořené panel splňující požadavky konkrétní diagnostické laboratoře (Soukupová 2016). Při testování zárodečných forem se cílí na mutace v nádorově predispozičních genech. Tyto mutace nemusí souviset pouze s hereditárním karcinomem prsu, ale také s hereditárními karcinomy trávicího traktu, ledvin, neuroendokrinními nádory, kožními nádory, nádory centrální nervové soustavy. Mezi mutované geny způsobující výše vypsané nádory patří například MHL, MHL2, APC, MUTYH, PTEN, BAP1, FLCN, MET, FLCN, MEN1 až MEN4 a další (Macháčková 2022). Na trhu je k dispozici široké spektrum komerčně dostupných NGS panelů genů pro vyšetřování hereditárních nádorových onemocnění. Jedná se například o panel CZE CANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application). Panel zahrnuje 219 cílových genů pro vyšetřování hereditárních malignit metodou sekvenování nové generace. Další využívanou možností jsou TruSight panely společnosti Illumina (“Targeting known variants for cancer related genes” 2023). V praktické části byl použit kit Hereditary Cancer Solution (Sophia Genetics), který se zaměřuje na 27 nejčastějších genů podílejících se na predispozici ke karcinomu prsu, vaječníku a střev (Tab. 2) Mezi dědičné karcinomy střev patří Familiární adenomatózní polypóza a Dědičný nepolypózní kolorektální karcinom, kdy jeho nejčastější formou je Lynchův syndrom (převzato z návodu ke kitu Hereditary Cancer Solution Sophia Genetics).

Tab.2: Seznam genů analyzovaných pomocí kitu Hereditary Cancer Solution (Sophia Genetics). Geny jsou rozřazeny podle predispozic k určitým nádorovým onemocněním.

Karcinom prsu a vaječníků	Syndromy střevní polypózy	Lynchův syndrom
ABRAXYS1	APC	MLH1
ATM	MUTYH	MLH2
BARD1	STK11	MSH6
BRCA1	PTEN	PMS5
BRCA2		EPCAM
BRIP		PMS2CL
CDH1		
CHEK2		
MRE11A		
NBN		
PALB2		
PIK3CA		
RAD50		
RAD51C		
STK		
TP53		

5.3.7. Výhody a nevýhody NGS

Hlavní výhodou je paralelní sekvenování velkého množství genů, které je časově i finančně efektivní (Desmedt et al. 2012). Hlavní omezením NGS v klinickém prostředí je zavedení potřebné infrastruktury, jako je počítačová kapacita a úložiště, odborné znalosti personálu potřebné ke komplexní analýze a interpretaci následných údajů (Behjati et al. 2013).

5.3.8. Srovnání se Sangerovou metodou

Hlavní rozdíl mezi NGS a Sangerovou metodou sekvenování je ve čtení a zpracovávání fragmentů, kdy v NGS je paralelně zpracováváno a čteno velké množství (miliony až miliardy) fragmentů, zatímco v Sangerově sekvenování je často zároveň čteno maximálně 96 fragmentů (Vojtěšek et al. 2015). Dále NGS zachycuje širší spektrum mutací než Sangerovo sekvenování. Spektrum variací DNA v lidském genomu zahrnuje malé změny bází (substituce), inserce a delece DNA, velké genomové delece exonů nebo celých genů a přestavby, jako jsou inverze a translokace. Tradiční Sangerovo sekvenování je omezeno na odhalování substitucí a malých insercí a delecí. U ostatních mutací se často provádějí specializované testy, jako je fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Sekvenováním NGS odpadá potřeba specializovaných testů a zároveň se získá celé spektrum genomických variant v jediném experimentu (Behjati et al. 2013). Dalším rozdílem je časová a finanční náročnost. Sekvenování genomu, které dříve vyžadovalo desítky let pomocí Sangerova sekvenování, lze pomocí NGS realizovat během několika dnů při 10 000 násobném až 100 000 násobném snížení nákladů (Desmedt et al. 2012)

5.3.9. Výsledky genetického testování

5.3.9.1. Nomenklatura

Systém pozičního číslování definuje jednotlivé referenční sekvence genů. Poziční číslování musí být jasné, jednoznačně identifikovatelné a je schvalováno komisí pro genovou nomenklaturu HGNC (HUGO Gene nomenclature Committee – dostupné na www.genenames.org). V roce 2000 HGVS (Human Genom Variation Society) vydala komplexní systém názvosloví pro mutační nálezy. Tímto bylo zavedeno jednotné číslování pozic sekvenčních variant, kde pozice c.1 je A iniciačního AUG kodonu. Získaná data jsou shromažďována v národním centru pro biotechnologické informace v USA (NCBI – National center for Biotechnology Information). Systematické názvosloví umožnilo vzniku databáze referenčních sekvencí lidského genomu HUGO (HUMAN Genome Project). Tento projekt byl

ukončen v roce 2003, ale neustále dochází k aktualizaci dat. Ekvivalentem jeho verzí jsou verze databáze USCS (University of California, Santa Cruz) Genome Browser (Macháčková 2022).

5.3.9.2. Klasifikace detekovaných sekvenčních variant

Pro využití sekvenačních technologií v genomické medicíně s cílem zlepšení péče o pacienta je potřebná přesná a konzistentní klasifikace nalezených variant (Iacocca et al. 2018). Varianty nalezené genetickým testováním jsou klasifikovány standardizovaným pětistupňovým systémem IARC (International Agency for Research on Cancer) na základě pravděpodobnosti patogenity (Tab. 3).

Tab.3: Pětistupňový klasifikační systém navržený pro detekování mutací v genetickém testování

Třída	Popis	Pravděpodobnost patogenity
5	patogenní	>0.99
4	pravděpodobně patogenní	0.95-0.99
3	nejasného významu	0.05-0.945
2	pravděpodobně benigní	0.001-0.045
1	benigní	<0.001

Systém byl navržen v roce 2008 a pro každou třídu jsou doporučena klinická opatření (Macháčková 2022). Varianty třídy 1,2 jsou považovány za klinicky nevýznamné. Naopak varianty třídy 4,5 jsou považovány za pravděpodobně patogenní/patogenní a jsou asociovány se vznikem nádorového onemocnění. Za zjevně patogenní mutace považujeme takové, které znemožňují syntézu funkčního proteinu (nonsense a frameshift mutace a mutace vyvolávající abnormální sestřih mRNA) (Heczková et al. 2012). Varianty třídy 3 jsou sekvenční varianty nejasného významu a jsou nalézány ve velkém počtu případů. Nejčastěji se jedná o missense mutace vedoucí k záměně jedné aminokyseliny či o in-frame delece, u kterých nedochází ke změně čtecího rámce a důsledkem je delece, či inserce několika málo aminokyselin. Jejich význam pro funkci proteinu a pro riziko vzniku nádorového onemocnění nelze jednoznačně určit, nazývají se tak mutace s nejasným významem (označované jako UV – Unclassified Variants nebo VUS – Variants of Unknown Significance) (Heczková et al. 2012). Pro zařazení mutací do jedné z pěti tříd se mohou využívat doporučení publikované v roce 2015 americkou společností pro lékařskou genetiku a genomiku ACMG (The American College of Medical Genetics and Genomics). Jejich studie si kládla za cíl vytvořit soubor kritérií a pravidel pro kombinaci těchto kritérií. Kombinace kritérií by měla vést k přesnějšímu určení patogenity nezávisle na interpretaci příčiny onemocnění u daného pacienta (např. stejná varianta by neměla být hlášena jako patogenní v jednom případě a nepatogenní v dalším případě jen proto,

že se nepředpokládá, že by vysvětlovala dané onemocnění). Mezi kritéria patří zastoupení variant v populační databázi, databáze asociací variant s onemocněním, výpočetní (in silico) prediktivní programy, kdy se může předpovídat dopad mutace na strukturu a funkci proteinu. Tato kritéria dělí nalezené varianty podrobněji než IARC (viz výše). Patogenní dělí na velmi silné, silné, středně silné a podpůrné. Benigní dělí na samostatné, silné a podpůrné. Varianty nejasného významu jsou zde definovány jako nesplňující ani jedno kritérium pro patogenní nebo benigní varianty nebo mají kritéria pro patogenní a benigní sady v rozporu (Richards et al. 2015). Pro zařazení mutací se mohou také používat kritéria canVIG. Mezi tyto kritéria patří populační údaje, výpočetní a prediktivní údaje, segregáční údaje, funkční data. (Garret et al. 2022). Pro dosažení standardizované a spolehlivé interpretace variant se využívá sdílení dat pomocí centralizovaných databází. Příkladem takové databáze je ClinVar (Iacocca et al. 2018). ClinVar zaznamenává informace o vztazích mezi lidským variantami a fenotypem, který se projevuje změnou zdravotního stavu. Zpracovává hlášení o variantách nalezených ve vzorcích pacientů, tvrzení o jejich klinickém významu, informace o předkladateli a další podpůrné údaje. Informace archivované v systému ClinVar jsou volně k dispozici uživatelům a organizacím, aby byla zajištěna co nejširší využitelnost pro komunitu lékařské genetiky ("ClinVar: What is ClinVar"). Mezi další databáze patří LOVD (Leiden Open Variation Database) vytvořená na Leidenské univerzitě v Nizozemí. Tato databáze opět shromažďuje informace o vztazích mezi nalezenými variantami a onemocněním. V databázi jsou shromažďovány všechny sekvenční varianty nalezené u jedinců spolu s informací o tom, zda by mohly mít příčinnou souvislost s onemocněním nebo ne. Dále LOVD obsahuje i informace o jedincích u nichž byly potvrzeny dané mutace, což může pomoci s predikcí průběhu onemocnění u jiných pacientů ("Leiden Open Variation Database" 2001-2023). Databáze lidských genových mutací (HGMD) je rozsáhlá sbírka zárodečných mutací publikovaných v odborné literatuře a které se nacházejí v jaderných genech. Tyto mutace jsou základem lidských dědičných onemocnění člověka nebo s nimi úzce souvisí. Databáze je dostupná online na adrese <http://www.hgmd.org>. V červnu 2020 obsahovala databáze více než 289 000 různých genových lézí ve více než 11 000 genech (Stenson et al. 2020). Vedle univerzálních databází zaměřujících se všechny lidské geny existují databáze zaměřující se na určité skupiny genů. Jednou z nich je BRCA Exchange (<https://brcaexchange.org>). V této databázi bylo zatím shromážděno více než 20 000 variant v genech BRCA1/2. Soubor dat je založený na sdílení informací ze stávajících databází například z LOVD, Breast Cancer Information Core (BIC), ClinVar. Cílem této databáze je lépe porozumět onemocněním sdružovaným s mutacemi v genech *BRCA1* a *BRCA2* (Cline et al. 2018). Další známou specifickou databází je InSight,

kteřá cílí na mutace v geny asociované s karcinomy zařívacího traktu (“InSiGHT variants databases”). Při objasňování variant a pro jejich následné zařazení se používají in silico výpočetní programy. Výpočetní programy obsahují nástroje, které předpovídají vliv missense změny na výslednou funkci nebo strukturu proteinu nebo zda má vliv na výsledný sestřih proteinu. Novější se zabývají i nekódujícími sekvencemi genomu (Richards et al. 2015). Mezi zástupce těchto softwarů patří PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2), který předpovídá dopad záměn aminokyselin na stabilitu a funkci lidských proteinů, provádí funkční popis jednonukleotidových polymorfismů (SNP), mapuje kódující SNP na genové transkripty, získává popis proteinových sekvencí a strukturní vlastností (Adzhubei et al. 2013). Dalším online dostupným softwarem je MutationTaster, který zvládá hodnotit kromě záměny aminokyselin i synonymní a intronické varianty. Vývoj softwaru byl zahájen v roce 2007. Pro určení povahy daného polymorfismu se provádí řada testů, které zahrnují např. záměny aminokyselin, potenciální ztrátu funkčních domén, vliv na sestřih (“MutationTaster” 2023). Pro hodnocení nálezů slouží jako referenční sekvence data zpracovaná v populačních databázích. Jednou z nejznámějších databází je gnomAD (The Genome Aggregation Database), kterou tvoří k roku 2021 sekvence 125 748 exomů z celého světa. Princip populačních databází spočívá v přirozeném výběru, kdy přirozený výběr odstraňuje škodlivé varianty z populace (Karczewski et al. 2021). Projekt A-C-G-T (Analýza českých genomů pro teranostiku) se zaměřuje na sestavení referenční databáze genetické informace pro českou populaci. (“Analýza českých genomů pro teranostiku” 2020).

6. Cíle praktické části práce

Praktická část bakalářské práce je zaměřena na problematiku interpretace variant detekovaných v souboru pacientů s hereditárními nádorovými onemocněními. Cílem praktické části bakalářské práce je seznámení se s metodou masivního paralelního sekvenování pomocí kitu SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution. Dále se práce zaměřuje na možnosti reklasifikace detekovaných variant na základě údajů o četnosti výskytu alelických frekvencí vybraných variant získaných analýzou genomů v rámci projektu „Analýza českých genomů pro teranostiku“. Součástí je dále práce s populačními databázemi.

7. Praktická část

7.1. Biologický Materiál

V rámci bakalářské práce byla využita data ze souboru 815 analyzovaných pacientů, kteří v rozmezí let 2018-2022 podstoupili genetické testování v laboratoři CGB a.s. pro podezření na přítomnost hereditárního nádorového syndromu. Odběr biologického materiálu a následné vyšetření bylo provedeno za základě žádanky indikujícího lékaře a informovaného souhlasu pacienta. Biologický materiál pro analýzu byl získán odběrem periferní krve pacienta. Izolace DNA byla provedena vysolovací metodou.

Dále byl pro hodnocení variant použit soubor vzorků z projektu A-C-G-T (Analýza českých genomů pro teranostiku), představující referenční českou sekvenci. . Do výzkumu byly zapojeni jedinci ve věku 30-55 let bez vážných genetických onemocnění a zároveň s rodiči pocházejících ze stejného regionu. Analyzovaným biologickým materiálem byla žilní krev, V době přípravy práce bylo v databázi analyzováno 673 osob.

7.2. Použité chemikálie

Sophia Hereditary Cancer Solution (Sophia Genetics, Švýcarsko)

Sophia DNA Library Prep kit I (Sophia Genetics, Švýcarsko)

Kappa Library Amplification kit (Roche, Švýcarsko)

MiSeq Reagent Kit v3, 600 cycle (Illumina, USA)

PhiX Control v3, 10nM (Illumina, USA)

QubitTM dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher, USA)

Nuclease Free Water Ambion (ThermoFisher, USA)

Ethanol 96% p.a. (Kulich, ČR)

D1000 Screen Tape Assay (ThermoFisher, USA)

7.3. Využité přístroje

Biohazard laminární box (Telstar Biostar, Španělsko)

Centrifuga (HWLAB, Čína)

Vortex (IKA, Německo)

Termocycler Proflex (ThermoFisher, USA)

Magnetický stojánek

Vakuový koncentrátor DNA Cenvac (N-Biotek, Korea)

Miseq (Illumina, USA)

Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen, ThermoFisher, USA)

TapeStation 4150 Agilent (ThermoFisher, USA)

Použité nástroje

Automatické pipety s rozsahem 20-200 μl , 0,5-10 μl , 2-20 μl ,

Špičky s filtrem na automatické pipety

Stripové mikrozkušavky

PCR mikrozkušavky

7.4. Příprava sekvenačního panelu Hereditary Cancer Solution (SOPHiA GENETICS)

Pro přípravu sekvenačních knihoven bylo během let 2018-2022 využito několik protokolů od firmy Sohia Genetics. Tento systém umožňuje analýzu 27 genů. Celý proces přípravy je rozdělen do několika kroků:

7.4.1. Příprava vzorků

Vzorky genomické DNA byly naředěny na pracovní koncentraci 50-100 ng/ μl v PCR vodě. Pro přípravu knihovny bylo použito 200ng genomické DNA do reakce pro 1 vzorek.

7.4.2. Enzymatická fragmentace a ligace adapterů

K naředěným vzorkům bylo přidáno 5 μl FX Enhanceru, pro ochranu před negativními vlivy. Vzorky byly propipetovány a stočeny. Poté byla připravena reakční směs smícháním 5,9 μl FX bufferu a 11,8 FX Enzymu. Následovalo přidání 15 μl vzniklé směsi ke vzorku. Takto upravené a propipetované vzorky byly umístěny do termocycleru a spuštěn program: 4°C / 1 min., 32°C / 5 min., 65°C / 30 sec, 4°C ∞ (teplota víka 70°C). Cílem této reakce byla enzymatická fragmentace vzorku.

V dalším kroku bylo provedena ligace adaptérových sekvencí. K vzorku bylo přidáno 5 μl adapterů s duálními indexy a premix připravený smícháním 23,8 μl ligázového pufru, 11,9 μl ligázy a 17,8 μl PCR vody. Takto upravené vzorky byly vloženy do termocycleru. Ligace probíhala 15min při 20°C.

Vzorek byl následně přečištěn AMPure XP magnetickými kuličkami. Ke každému vzorku bylo přidáno 80 μl resuspendovaných AMPure XP kuliček a směs byla důkladně promíchána. Vzorek byl inkubován 5 min. při pokojové teplotě a dalších 5 min. na magnetické stojánku pro zachycení kuliček. Po inkubaci bylo odstraněno 170 μl vyčeřeného roztoku. Vzorek byl 2x promyt přidáním 170 μl roztoku 80 % etanolu. Po důkladném odstranění etanolu se vzorek nechal sušit vzduchu po dobu 5 min. Po vysušení kuliček bylo přidáno 105 μl PCR vody a opět byla provedena inkubace po dobu 5 minut při pokojové teplotě a dalších 5 minut na magnetickém stojánku. Poté bylo přeneseno 100 μl eluátu k 60 μl AMPure XP kuliček a opět byla provedena inkubace (1x 5min. při pokojové teplotě následně 1x 5min. na magnetickém stojánku 2x 5 minut) a poté bylo přeneseno 140 μl eluátu k 20 μl AMPure XP kuliček, po

důkladném promíchání, byla provedena inkubace (1x 5min. při pokojové teplotě následně 1x 5min. na magnetickém stojánku). Poté přišlo na řadu odstranění 150 µl eluátu a oplach přidáním 170 µl roztoku 80 % etanolu. Po důkladném odstranění etanolu se vzorek nechal sušit na vzduchu po dobu 4 min a bylo přidáno 20µl IDTE. Vzorek i s kuličkami byl následně resuspendován.

7.4.3. Amplifikace knihovny a přečištění knihovny

Byla připravena reakční směs (MasterMix) smícháním 28,75 µl 2x Hifi PCR Master mixu, 5,9 µl směsi primerů, 11,8 µl PCR vody. Vzniklý MasterMix byl promíchán na vortexu a krátce centrifugován. Ke vzorku bylo přidáno 30 µl reakční směsi, po promíchání byl vzorek vložen do termocycleru a spuštěn program 98°C / 2 min., (98°C / 20 sec., 60°C / 30 sec, 72°C / 30 sec)x8, 72°C / 60 sec, 10°C < ∞ (teplota víka 99°C).

Po amplifikaci knihovny byl vzorek opět přečištěn pomocí AMPure XP magnetických kuliček. Ke každému vzorku bylo přidáno 50 µl resuspendovaných AMPure XP kuliček a směs byla důkladně promíchána. Opět následovala inkubace po dobu 5 min. při pokojové teplotě, 5 min. na magnetické stojánku pro zachycení kuliček. Po inkubaci bylo odstraněno 90 ul vyčereného roztoku a zbylé kuličky byly promyty přidáním 170 µl roztoku 80 % etanolu. Po důkladném odstranění etanolu se vzorek nechal sušit na vzduchu po dobu 5 min. Po vysušení kuliček bylo přidáno 20 µl PCR vody a opět byla provedena inkubace po dobu (2x 5 minut, popis viz výše). Po proběhnutí inkubace bylo 18 µl vzorku přeneseno do nové zkumavky.

7.4.4. Kvantifikace knihoven a kontrola kvality

Zjištění přesné koncentrace knihovny bylo provedeno na přístroji Qubit pomocí Qubit ds DNA High Sensitive Assay Kitu. 2 µl 4x ředěné knihovny bylo smícháno s 198 µl 1x ds DNA HS working solution, po 2 minutové inkubaci bylo provedeno měření. Šlo o zjištění koncentrace vzorků pro následný výpočet k poolování jednotlivých knihoven v následujícím kroku.

7.4.5. Poolování knihovny

Ze získaných hodnot z předchozího kroku byl vypočítán objem vzorku pro poolování, v případě 4 vzorků je třeba do reakce přidat 300 ng jednotlivých knihoven. Po výpočtu objemů vzorky mohlo dojít k jejich sloučení do jedné stripové zkumavky.

$$\text{Výpočet podle vzorce: } \text{Objem knihovny v } \mu\text{l} = \frac{300\text{ng}}{\text{Koncentrace vzorku} \times 4[\text{ng}/\mu\text{l}]}$$

K poolu bylo pro stabilizaci přidáno 2 µl Blocking oligos xGen Univeras Blockers – TS Mix a 5 µl Human Cot DNA. Pool byl vysušen na vakuovém koncentrátoru.

7.4.6. Hybridizace

V tomto kroku proběhla hybridizace DNA pacienta s próbami. Hybridizační premix byl připraven smícháním 8,5 µl 2x Hybridization Buffer; 3,4 µl Hybridization Buffer Enhancer; 1,1 µl PCR H₂O. 13 µl hybridizační směsi bylo přidáno k vysušené peletě, po důkladném resuspendování byl vzorek přenesen do nové PCR mikrozkušavky a inkubován v termocycleru při teplotě 95 °C po dobu 10 minut, poté byl vzorek přesunut do druhého bloku termocycleru, nahřátého na 65 °C a ke směsi bylo přidáno 4 µl prób. Vzorek s Próbami byl inkubován v termocycleru při teplotě 65 °C po dobu 4 hodin. Inkubací vznikl komplex próba-DNA fragment, kdy se próby navázaly na hledané fragmenty genů.

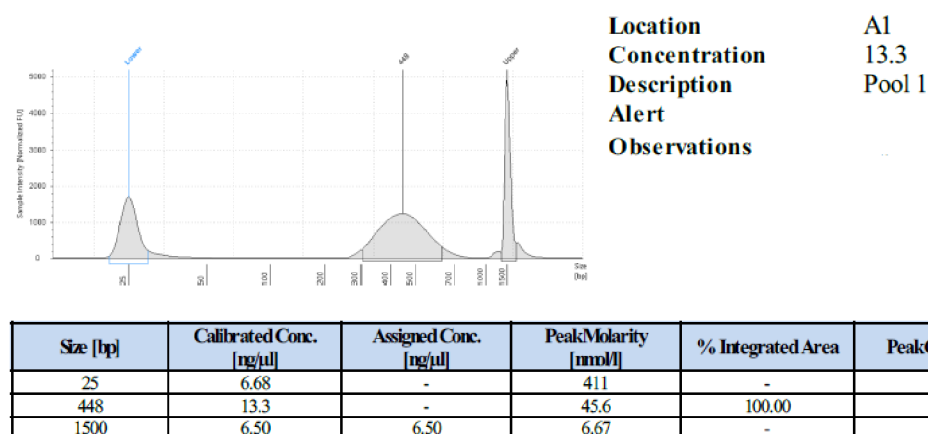
7.4.7. Navázání hybridizovaných prób na streptavidinové kuličky

Před koncem hybridizační reakce byly připraveny streptavidinové kuličky. Po důkladném resuspendování kuliček bylo 100 µl kuliček přeneseno do nové PCR zkumavky a byl dvakrát proveden oplach kuliček přidáním 200 µl promývacího pufru. Po důkladném odsátí promývacího pufru byla PCR zkumavka s umístěna do termocycleru, nahřátého na 65 °C a ke kuličkám bylo přidáno 17 µl hybridizační reakce. V tomto kroku došlo k vychytání komplexu próba-DNA fragment pomocí streptavidinových kuliček. Po uplynutí 45 minutové inkubace, bylo provedeno odmytí nenavázané DNA. Ke vzorku s hybridizovanými cílovými oblastmi/streptavidinovými kuličkami bylo přidáno 100 µl promývacího pufru. I při teplotě 65 °C po odstranění supernatantu bylo ke vzorku přidáno 200 µl promývacího pufru (stringent wash buffer) a následovala inkubace po dobu 5 minut při teplotě 65°C. Po odstranění supernatantu došlo k další sérii promytí již při pokojové teplotě. Vzorek byl promyt postupným přidáním 200 µl promývací pufrů I, II, III, IDTE. Po důkladném odsátí pufru IDTE bylo ke vzorku přidáno 20 µl PCR vody a následovala amplifikace knihovny pomocí reakční směsi. Reakční směs (mastermix) byla připravena smícháním 2,5 µl PCR vody, 2,5 µl Library Amplification Primer mixu a 25 µl KAPA HIFI HotStart Ready Mixu. K resuspendovanému vzorku i se streptavidinovými kuličkami bylo přidáno 30 µl mastermixu, po promíchání a krátké stočení byl vzorek vložen do termocycleru a spuštěn program: 98°C / 45 sec., 14x (98°C / 15 sec., 60°C / 30 sec, 72°C / 30 sec), 72°C / 60 sec, 10°C < ∞ (teplota víka 99°C). Po proběhlé amplifikaci následovalo opět přečištění pomocí AMPure XP magnetických kuliček. Ke každému vzorku bylo přidáno 50 µl resuspendovaných AMPure XP kuliček a směs byla důkladně promíchána. Opět následovala inkubace po dobu 5 min. při pokojové teplotě a 5 min. na magnetickém stojánku pro zachycení kuliček. Po inkubaci bylo odstraněno 90 ul vyčrešeného roztoku a zbylé kuličky byly promyty přidáním 170 µl roztoku 80 % etanolu. Po důkladném odstranění etanolu se vzorek nechal sušit na vzduchu po dobu 5 min. Po

vysušení kuliček bylo přidáno 20 µl PCR vody a opět byla provedena inkubace po dobu (1x 5min. při pokojové teplotě následně 1x 5min. na magnetickém stojánku). Po proběhnutí inkubace bylo 18 µl vzorku přeneseno do nové zkumavky. Poté byla stanovena fluorimetricky stanovena koncentrace knihovny a ověřeno rozložení fragmentů knihovny na přístroji TapeStation (Agilent) pomocí D1000 Screen Tape Assay. Vzorek na tuto analýzu byl připraven smícháním 1 µl knihovny a 3 µl pufru, následně vortexován po dobu 1minuty a krátce stočen. Optimální rozložení fragmentů je v rozmezí 300-700 bp (Obr. 12).

7.4.8. Sekvenování Miseq

Sekvenování připravených knihoven bylo provedeno na přístroji Miseq pracovníky CGB laboratoře. Výstupem ze sekvenátoru byl soubor ve formátu FASTQ, který obsahoval sekvence jednotlivých čtení („readů“). Data v tomto formátu byla použity pro následnou analýzu.



Size [bp]	Calibrated Conc. [ng/µl]	Assigned Conc. [ng/µl]	Peak Molarity [nmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	6.68	-	411	-		Lower Marker
448	13.3	-	45.6	100.00		
1500	6.50	6.50	6.67	-		Upper Marker

Obr.12.: Příklad zpracovaného výsledku analýzy z přístroje přístroji TapeStation (Agilent) pomocí D1000 Screen Tape Assay. Osa x značí velikost fragmentů, osa y jejich koncentraci. První a poslední píky jsou referenční, prostřední pik značí rozmezí velikosti fragmentů ve vzorku. Tabulka pod grafem shrnuje výsledky.

7.4.9. Analýza sekvenačních dat

Analýza získaných dat byla provedena pomocí bioinformatického softwaru Sophia-DDM®, který umožňuje rychlou filtraci, identifikaci a i předběžnou klasifikaci detekovaných variant. Analyzovaná data byla porovnána s referenční sekvencí příslušného genu. V případě, že byl nalezen rozdíl od referenční sekvence, bylo nutno provést interpretaci nálezu detekovaných variant.

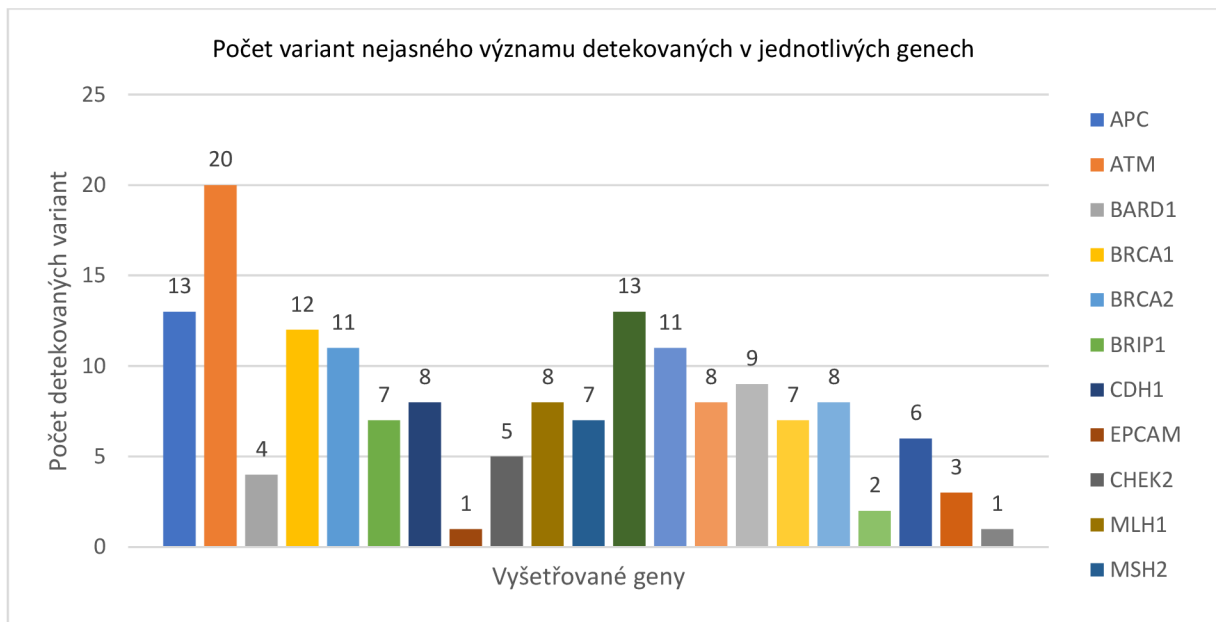
8. Výsledky

Reklasifikace detekovaných variant

Pro reanalýzu byl vybrán soubor 815 pacientů vyšetřených v CGB laboratoři a.s. pro podezření na hereditární nádorový syndrom. Tento soubor pacientů byl analyzován v průběhu let 2018 – 2022. Z celého souboru klasifikovaných variant byla vybrána kategorie variant nejasného významu (VUS) (Tab. 4). V této kategorii, lze předpokládat největší změny v klasifikaci variant na základě nových informací nejen na mezinárodní úrovni, ale právě i na základě srovnání výskytu variant s českou populační databází získanou v projektu „Analýza českých genomů pro teranostiku“.

Tab.4: Zastoupení detekovaných variant třídy 3-5

Třída	Počet detekovaných variant
Varianty nejasného významu	164
Pravděpodobně patogenní varianty	3
Patogenní varianty	49



Obr.13: Graf: Počet variant nejasného významu detekovaných v jednotlivých genech

V analyzovaném souboru bylo detekováno 164 variant klasifikovaných jako varianty nejasného významu. Soubor variant byl doplněn o údaje z databáze populačních frekvencí gnomAD, a srovnán s údaji v české populační databázi z projektu A-C-G-T. V souboru byly identifikovány varianty s nulovým zastoupením v databázi A-C-G-T (Tab. 5). Dále jsou uvedeny varianty zastoupené i v české populaci. (Tab. 6)

Tab.5: Seznam variant genů s nulovým zastoupením v databázi A-C-G-T

Gen	Varianta	ID dbSNP	Počet detekovaných alel (ACGT grant)/Celkový počet
APC	c.1304A>G	/	0/1346
APC	c.2180G>A	rs1215349287	0/1346
APC	c.2308T>G	/	0/1346
APC	c.2627G>A	rs373428732	0/1346
APC	c.2924A>G	/	0/1346
APC	c.3653C>T	rs377640390	0/1346
APC	c.4318C>A	rs1554085758	0/1346
APC	c.7205A>G	rs745843442	0/1346
APC	c.7809A>C	rs1580686817	0/1346
APC	c.7858T>C	rs587781816	0/1346
ATM	c.579T>C	/	0/1346
ATM	c.670A>G	rs145053092	0/1346
ATM	c.749G>A	rs56123940	0/1346
ATM	c.1043T>C	/	0/1346
ATM	c.1837G>T	rs200124136	0/1346
ATM	c.2522A>G	rs587781812	0/1346
ATM	c.3740T>C	rs1064793581	0/1346
ATM	c.3964C>A	rs144535256	0/1346
ATM	c.4424A>G	rs34640941	0/1346
ATM	c.4631A>G	rs779718362	0/1346
ATM	c.4768C>T	rs35962982	0/1346
ATM	c.4856G>A	rs730881393	0/1346
ATM	c.4969A>C	/	0/1346
ATM	c.5262G>T	rs748900588	0/1346
ATM	c.7375C>T	rs730881383	0/1346
ATM	c.8495G>A	rs529296539	0/1346
ATM	c.8965C>G	rs147695170	0/1346
BARD1	c.659T>C	rs138593305	0/1346
BARD1	c.1835A>T	rs201140528	0/1346
BARD1	c.2137G>A	rs546077003	0/1346
BARD1	c.2282G>A	rs142155101	0/1346
BRCA1	c.80+15G>C	rs771594437	0/1346
BRCA1	c.341C>T	/	0/1346
BRCA1	c.858G>A	/	0/1346
BRCA1	c.898G>A	rs886040330	0/1346
BRCA1	c.1179A>G	/	0/1346
BRCA1	c.2268G>A	/	0/1346
BRCA1	c.3247A>C	rs397507213	0/1346
BRCA1	c.3711A>G	rs80357388	0/1346
BRCA1	c.4151G>A	rs786203545	0/1346
BRCA1	c.4220T>C	rs80357492	0/1346
BRCA1	c.4843G>A	rs80356987	0/1346
BRCA1	c.5290C>A	/	0/1346
BRCA2	c.202A>G	rs1593882634	0/1346

<i>BRCA2</i>	c.1817C>T	rs80358469	0/1346
<i>BRCA2</i>	c.3021T>G	/	0/1346
<i>BRCA2</i>	c.3075_3076delinsTT	rs587779362	0/1346
<i>BRCA2</i>	c.4290T>G	/	0/1346
<i>BRCA2</i>	c.4516T>C	rs876659011	0/1346
<i>BRCA2</i>	c.4960T>G	rs876659012	0/1346
<i>BRCA2</i>	c.6215C>A	rs80358862	0/1346
<i>BRCA2</i>	c.9371A>T	rs28897759	0/1346
<i>BRCA2</i>	c.9745A>G	/	0/1346
<i>BRIP1</i>	c.1_2delAT	rs876661246	0/1346
<i>BRIP1</i>	c.139C>G	rs28903098	0/1346
<i>BRIP1</i>	c.823A>G	rs587781425	0/1346
<i>BRIP1</i>	c.1973G>A	rs759142191	0/1346
<i>BRIP1</i>	c.2035C>T	rs1555601056	0/1346
<i>BRIP1</i>	c.3336T>A	rs369843642	0/1346
<i>CDH1</i>	c.1592A>G	rs1596960354	0/1346
<i>CDH1</i>	c.2329G>A	rs372989292	0/1346
<i>CDH1</i>	c.2374A>C	rs759380419	0/1346
<i>CDH1</i>	c.2474C>T	rs587781312	0/1346
<i>CDH1</i>	c.-44G>A	rs886041159	0/1346
<i>CDH1</i>	c.860C>A	/	0/1346
<i>EPCAM</i>	c.185-13G>T	/	0/1346
<i>CHEK2</i>	c.*2dupC	rs749257861	0/1346
<i>CHEK2</i>	c.*2dupC	rs749257861	0/1346
<i>CHEK2</i>	c.1312G>T	rs200050883	0/1346
<i>CHEK2</i>	c.598G>A	rs730881704	0/1346
<i>MLH1</i>	c.44T>C	rs864622396	0/1346
<i>MLH1</i>	c.175A>T	/	0/1346
<i>MLH1</i>	c.241A>G	rs786203745	0/1346
<i>MLH1</i>	c.349A>G	rs965720330	0/1346
<i>MLH1</i>	c.1007G>A	rs587781750	0/1346
<i>MLH1</i>	c.1652A>C	rs63750271	0/1346
<i>MLH1</i>	c.1897-8G>T	/	0/1346
<i>MLH1</i>	c.453G>A	rs369521379	0/1346
<i>MSH2</i>	c.1547G>T	rs373564353	0/1346
<i>MSH2</i>	c.1589A>G	/	0/1346
<i>MSH2</i>	c.1601G>A	rs587778523	0/1346
<i>MSH2</i>	c.2558A>C	rs63750797	0/1346
<i>MSH2</i>	c.2717T>G	rs587780687	0/1346
<i>MSH2</i>	c.784G>C	rs1553351739	0/1346
<i>MSH2</i>	c.815C>T	rs34136999	0/1346
<i>MSH6</i>	c.281A>T	/	0/1346
<i>MSH6</i>	c.727C>T	rs377216828	0/1346
<i>MSH6</i>	c.884A>G	rs267608051	0/1346
<i>MSH6</i>	c.979A>G	rs730881814	0/1346
<i>MSH6</i>	c.1936A>G	/	0/1346
<i>MSH6</i>	c.2173A>G	rs148898662	0/1346

<i>MSH6</i>	c.2230G>A	/	0/1346
<i>MSH6</i>	c.2302C>G	rs35946687	0/1346
<i>MSH6</i>	c.3104G>T	rs730881801	0/1346
<i>MSH6</i>	c.4001+7A>T	/	0/1346
<i>MUTYH</i>	c.349-15G>A	/	0/1346
<i>MUTYH</i>	c.667A>G	rs200872702	0/1346
<i>MUTYH</i>	c.985G>A	rs147718169	0/1346
<i>MUTYH</i>	c.1061G>A	/	0/1346
<i>MUTYH</i>	c.1258C>A	rs144079536	0/1346
<i>MUTYH</i>	c.1274A>G	rs1205029214	0/1346
<i>MUTYH</i>	c.1405G>A	rs779701238	0/1346
<i>MUTYH</i>	c.1547C>T	rs587778542	0/1346
<i>MUTYH</i>	c.1567C>T	rs147480076	0/1346
<i>NBN</i>	c.37+3A>G	rs764356392	0/1346
<i>NBN</i>	c.278C>T	rs12721593	0/1346
<i>NBN</i>	c.506G>A	rs776134250	0/1346
<i>NBN</i>	c.671G>A	rs199845467	0/1346
<i>NBN</i>	c.1825C>A	rs372012641	0/1346
<i>PALB2</i>	c.228A>G	rs1555461872	0/1346
<i>PALB2</i>	c.1910C>T	rs878855104	0/1346
<i>PALB2</i>	c.2586+8G>C	/	0/1346
<i>PALB2</i>	c.2922G>T	rs730881892	0/1346
<i>PALB2</i>	c.2978C>T	rs61756146	0/1346
<i>PALB2</i>	c.3083G>A	rs779642624	0/1346
<i>PALB2</i>	c.3191A>G	rs730881893	0/1346
<i>PALB2</i>	c.3428T>A	rs62625284	0/1346
<i>PMS2</i>	c.572A>G	rs375289386	0/1346
<i>PMS2</i>	c.1762T>A	/	0/1346
<i>PMS2</i>	c.2127C>T	rs199943748	0/1346
<i>PMS2</i>	c.2276-14T>C	rs1178201870	0/1346
<i>PMS2</i>	c.2288A>G	rs587780052	0/1346
<i>PMS2</i>	c.2396G>A	rs587780055	0/1346
<i>RAD50</i>	c.129+5G>A	rs587781409	0/1346
<i>RAD50</i>	c.521A>G	rs370955165	0/1346
<i>RAD50</i>	c.785T>G	rs201728859	0/1346
<i>RAD50</i>	c.1315_1317delCTGinsATT	/	0/1346
<i>RAD50</i>	c.1794-10C>T	/	0/1346
<i>RAD51C</i>	c.-66_-47del	/	0/1346
<i>RAD51D</i>	c.412A>G	rs141690729	0/1346
<i>RAD51D</i>	c.614T>C	rs587781649	0/1346
<i>RAD51D</i>	c.629C>T	rs376855484	0/1346
<i>RAD51D</i>	c.715C>T	rs770250516	0/1346
<i>RAD51D</i>	c.820A>C	/	0/1346
<i>RAD51D</i>	c.880A>C	/	0/1346
<i>STK11</i>	c.85A>T	rs864622719	0/1346
<i>STK11</i>	c.1130C>T	rs199973552	0/1346
<i>TP53</i>	c.1127C>T	rs1555524151	0/1346

Tab.6.: Seznam variant genů s nenulovým zastoupením v databázi A-C-G-T.

Legenda: Četnost značí poměr zastoupení alelické frekvence v A-C-G-T databázi a zastoupení alelické frekvence v gnomAD databázi v evropské nefinské populaci

Gen	Varianta	Počet detekovaných alel (ACGT grant)/Celkový počet	Alelická frekvence varianty ACGT GRANT %	Alelická frekvence (gnomad v2.1.1) v %		Četnost
				Frekvence celková	Evropské nefinské populaci	
APC	c.295C>T	1/1346	0.0743	0.0399	0.0736	1.0101
APC	c.3920T>A	2/1346	0.1486	0.1855	0.0636	2.3348
APC	c.8057T>C	1/1346	0.0743	0.0012	0.0026	28.1311
ATM	c.6067G>A	6/1346	0.4458	0.1407	0.2300	1.9381
ATM	c.6860G>C	2/1346	0.1486	0.0269	0.0512	2.9038
ATM	c.8734A>G	1/1346	0.0743	0.0205	0.0387	1.9193
BRCA2	c.9234C>T	1/1346	0.0743	0.0018	0.0031	23.8122
BRIP1	c.1255C>T	2/1346	0.1486	0.0350	0.0481	3.0904
CDH1	c.49-27G>C	1/1346	0.0743	varianty nebyla nalezena v gnomadu		
CDH1	c.2413G>A	3/1346	0.2229	0.0230	0.2170	1.0271
CHEK2	c.246_260delCCAAGAACCTGAGGA	1/1346	0.0743	0.0149	0.0108	6.8537
MSH6	c.*49_*68dup	5/1346	0.3715	0.0108	0.0212	17.5553
MSH6	c.3758T>A	1/1346	0.0743	0.0149	0.0209	3.5480
MSH6	c.3961A>G	1/1346	0.0743	0.0139	0.0267	2.7846
MUTYH	c.920G>A	1/1346	0.0743	0.0078	0.0077	9.5876
MUTYH	c.1420C>T	1/1346	0.0743	0.0049	0.0101	7.3851
NBN	c.511A>G	16/1346	1.1887	0.1500	0.2565	4.6343
NBN	c.643C>T	3/1346	0.2229	0.2452	0.4045	0.5510
NBN	c.803C>T	1/1346	0.0743	0.0035	0.0070	10.6546
PALB2	c.3508C>T	2/1346	0.1486	0.0046	0.0093	15.9962
PMS2	c.1567T>A	1/1346	0.0743	0.0163	0.0217	3.4221
RAD50	c.1052-23T>C	2/1346	0.1486	0.1210	0.2124	0.6996
RAD50	c.1094G>A	1/1346	0.0743	0.0432	0.0613	1.2124
RAD50	c.3036+5G>A	1/1346	0.0743	0.1272	0.0652	1.1388
RAD51C	c.870T>A	2/1346	0.1486	0.0053	0.0109	13.6948
STK11	c.559G>A	2/1346	0.1486	0.0034	0.0047	31.6550

Na základě doplnění populačních frekvencí z databáze projektu A-C-G-T (Tab. 6) byly identifikovány varianty s nenulovou frekvencí v české populaci. Přes aktuálně relativně malou velikost souboru dat v A-C-G-T databázi se podařilo identifikovat soubor variant vyskytujících se v české populaci relativně častěji v porovnání s údaji v mezinárodní databázi gnomAD pro evropskou nefinskou populaci. Celkem bylo v aktuální A-C-G-T databázi identifikováno 26 variant s nenulovým zastoupením. Varianta s nejvíce zastoupenou alelickou frekvencí v databázi projektu A-C-G-T byla c.511A>G v genu *NBN*. Tato varianta měla alelickou frekvenci v A-C-G-T databázi 1.1887 %. Její zastoupení v gnomAD databázi v nefinské evropské populaci je stanoveno na 0.2565 %. Tato varianta je tedy v souboru české populace podle prozatímních výsledků A-C-G-T zastoupena 4.63x častěji v porovnání s databází gnomAD pro nefinskou evropskou populaci. Druhou nejvyšší alelickou frekvenci v A-C-G-T (0.4458%) měla varianty c.6067G>A v genu *ATM*. Byla 1,938x častější v porovnání s databází gnomAD pro nefinskou evropskou populaci. Třetí nejvyšší alelickou frekvenci - 0.3715% v A-C-G-T databázi měla varianta c.*49_*68dup v genu *MSH6*. V porovnání s frekvencí v gnomAD databázi s evropskou nefinskou populací (0.0212 %) bylo zjištěno, že je 17.55x častěji zastoupena v české populaci. Shodná alelická frekvence 0.2229 % v databázi A-C-G-T byla nalezena pro varianty c.2413G>A v genu *CDH1* a c.643C>T v genu *NBN*. Při porovnání s frekvencí pro nefinskou evropskou populaci s gnomAD databází bylo zjištěno, že varianta c.2413G>A téměř stejně často (1,02x) i v české populaci a varianta

c.643C>T se vyskytuje téměř dvakrát častěji v nefínské evropské populaci. Zastoupení alelické frekvencí variant c.3920T>A a c.6860G>C v genu *ATM*, c.1255C>T v genu *BRIP1*, c.3508C>T v genu *PALB2*, c.1052-23T>C v genu *RAD50*, c.870T>A v genu *RAD51C* a varianty c.559G>A v genu *STK11* bylo 0.1486 %. Po porovnání s jejich zastoupením v nefínské evropské populaci z databáze gnomAD bylo zjištěno, že varianta c.559G>A v genu *STK11* by měla 31.6x častěji zastoupena v české populaci. 15.9x častěji by měla být v české populaci také zastoupena varianta c.3508C>T v genu *PALB2*. Nicméně varianta c.1052-23T>C v genu *RAD50* byla zastoupena ve vyšší frekvenci v nefínské evropské populaci (0.2124 %) v české populaci jenom v 0,1486%. Zastoupení alelických frekvencí variant c.295C>T a c.8057T>C v genu *APC*, c.8734A>G v genu *ATM*, c.9234C>T v genu *BRCA2*, c.49-27G>C v genu *CDH1*, c.246_260delCCAAGAACCTGAGGA v genu *CHEK2*, c.3758T>A a c.3961A>G v genu *MSH6*, c.920G>A a c.1420C>T v genu *MUTYH*, c.803C>T v genu *NBN*, c.1567T>A v genu *PMS2*, c.1094G>A a c.3036+5G>A v genu *RAD50* měli hodnotu 0.0743 %. Po porovnání s jejich alelickou frekvencí v nefínské evropské populaci, bylo zjištěno že varianta c.803C>T v genu *NBN* se vyskytovala 10.6x častěji v české populaci.

Z vytvořeného souboru byla vybrána varianta s nejvyšší alelickou frekvencí nalezenou v projektu A-C-G-T NBN:c.511A>G a dále varianta PALB2:c.3508C>T. Tyto varianty byla detailněji analyzovány.

NBN:c.511A>G

Jedná se o sekvenční variantu c.511A>G, p.(Ile171Val) detekovanou v heterozygotním stavu v 5. exonu *NBN* genu. Tato varianta způsobuje změnu aminokyseliny isoleucin na valin v C-terminálním konci polypeptidového řetězce ve vysoce konzervované BRCT doméně proteinu nibrin, což narušuje interakci s dalšími proteiny DNA reparace a buněčné regulace. Uvedená varianta je v databázi ClinVar interpretována jako varianta s konfliktní interpretací patogenity (VUS/benigní/pravděpodobně benigní). Databáze LOVD klasifikuje variantu jako benigní/VUS. V databázi gnomAD se varianta vyskytovala v evropské nefínské populaci s frekvencí 0,26 %, v databázi ACGT s frekvencí 1.19 %, v databázi projektu Český genom s frekvencí 0,81 % a v databázi Národního centra lékařské genomiky s frekvencí 1,1 %. Dle literatury se u nosičů této varianty vyskytuje zvýšené riziko vývoje nádorů, především lymfomů ((Berardinelli et al. 2013), (Zhang, et al.2006)). Dle souhrnné české publikace Klinická Onkologie (rok 2019, Supplementum 2) by se tato varianta měla v současnosti hodnotit spíše jako risk faktor, a dle empirického rizika vyplývajícího z rodinné anamnézy,

dát v konkrétních případech doporučení ke sledování (Koudová et al. 2019). Výše uvedené podporuje i nález frekvence výskytu dané varianty v ACGT projektu v české populaci. A velmi pravděpodobně se jedná o variantu, která nemusí mít tedy přímou souvislost s hereditárními nádorovými chorobami.

PALB2: c.3508C>T

Jde o sekvenční změnu c.3508C>T, p.(His1170Tyr) detekovanou v heterozygotním stavu v exonu 13 *PALB2* genu. V databázích ClinVar a LOVD je varianta hodnocena jako varianta s konfliktní interpretací patogenity (benigní, pravděpodobně benigní, VUS). Dle populační databáze gnomAD se vyskytuje daná varianta u evropské ne-finské populace s frekvencí 0,0093%. Predikční program MutationTaster hodnotí variantu jako polymorfismus, tedy bez výrazného negativního vlivu na protein. Varianta byla popsána u pacientů s karcinomem prsu nebo vaječníků (Myszka et al. 2018), ale také byla zachycena u zdravých kontrol (Ramus et al. 2015)). Varianta byla klasifikována jako varianta nejasného klinického významu. Tato varianta byla v projektu ACGT 15.9x častěji nalezena v české populaci. Větší zastoupení dané varianty v česká populaci může naznačovat, že se velmi pravděpodobně jedná o variantu, která nemá souvislost s hereditárními nádorovými chorobami. Proto je možné, že bude v následujících letech klasifikována spíše jako pravděpodobně benigní než jako varianta nejasného významu.

9. Diskuze

V rámci bakalářské práce bylo z 815 analyzovaných sekvencí vzorků DNA pacientů s podezřením na hereditární nádorové onemocnění bylo vyfiltrováno 164 variant nejasného významu. Data byla doplněna o nově získané frekvence alelického zastoupení zjištěné při analýze genomu české populace v rámci projektu A-C-G-T (Analýza českých genomů pro teranostiku) a informací o výskytu frekvencí variant v mezinárodní populační databázi gnomAD a následně porovnány. A-C-G-T databáze si klade za cíl vytvořit databázi ryze českých genomů. K datu zpracování bakalářské práce obsahovala A-C-G-T databáze 673 analyzovaných genomů z plánovaných 1000, což mohl být jeden z důvodů, proč v ní některé varianty nebyly detekovány. Populační databáze gnomAD obsahovala k 27.4.2023 134 187 analyzovaných genomů. Alelické frekvence byly srovnávány s frekvencemi pro evropskou nefinskou populaci, kde jsou zahrnuty genomy obyvatel Jižní Evropy, Západní Evropy,

Estonska, Bulharska a Švédsko. Po srovnání variant s nulovou frekvencí v databázi A-C-G-T a jejich frekvencí v databázi gnomAD byla zjištěna u některých variant jejich relativně vyšší četnost v české populaci. Varianty specifické pro českou populaci, může být obtížné dohledat v celosvětových databázích. Toto byl jeden z důvodů vzniku projektu A-C-G-T.

Kromě A-C-G-T projektu mapuje český genom projekt Český genom/multiom dostupný online na www.czechgenome.cz. Tento projekt byl spuštěn v roce 2017 a dosud má zmapovaných přibližně 677 genů. Jedním z jeho výsledků je online dostupný nástroj vyhledávající detekované varianty v české populaci Gen seeker. Další databázi mapující český genom je zřizována Národním centrem lékařské genomiky. Obsahuje 1055 vzorků z toho 442 mužských a 613 ženských. 572 vzorků představuje neselektovanou populaci (běžná populace bez závažných onemocnění) a 483 představuje populaci starší 70 let (NCMG controls). Tato databáze obsahuje všechny varianty s populační frekvencí menší než 5%. Další populační databázi ve které je zastoupen český genom je European '1+ Million Genomes' Initiative. Tato iniciativa sdružuje více než 20 evropských zemí s cílem vytvořit nejméně 1 milion sekvenovaných genomů.

Na základě četnosti zastoupení byly sestaveny detekované varianty rozděleny do dvou skupin – s nulovým a nenulovým zastoupením v projektu A-C-G-T. Ze souboru vyfiltrovaných variant bylo nalezeno 138 variant s nulovým zastoupením v A-C-G-T. Varianty s nulovým zastoupením potvrzují to, že se velmi pravděpodobně jedná o vzácně se vyskytující varianty i v české populaci. Určit jejich klinickou významnost a přesně je dále klasifikovat do konkrétní třídy je obtížné a tyto varianty nejspíš zůstanou v kategorii VUS. V souboru bylo také nalezeno 26 variant se nenulovým zastoupením v A-C-G-T databázi. Po porovnání s frekvencí v evropské nefínské populaci v databázi gnomAD, bylo zjištěno že většina hodnocených variant se v české populaci vyskytují relativně častěji. Nejvíce zastoupená byla varianta c.511A>G v genu *NBN*. Její zastoupení bylo 16 alel z 1346 alel, populační frekvence v A-C-G-T databázi byla 1.19%. Porovnáním s populační frekvencí v evropské nefínské populaci, bylo zjištěno, že se tato varianta vyskytuje v české databázi 4.63x častěji než evropské nefínské populaci. Četnost výskytu byla vypočítána i pro další varianty a zaznamenána ve výsledcích. Díky nenulovému zastoupení frekvencí v databázi českých genomů získaných v rámci projektu A-C-G-T je mohou nově zjištěné informace být jeden z podkladů k případné revizi jejich interpretace v rámci reklasifikace z původně VUS na pravděpodobně benigní. Nicméně samotný proces reklasifikace variant z třídy VUS do jasných klinicky významných tříd (benigní vs. patogenní) je mnohem složitější a zahrnuje řadu parametrů, kdy jedním důležitých z nich je i informace o frekvencích výskytu dané varianty v populaci.

10. Závěr

V rámci bakalářské práce byla provedena literární rešerše zabývající se hereditárními nádorovými onemocněními. Detailněji byly popsány geny podílející se na vzniku hereditárního karcinomu prsu a vaječníků. Byla popsána jejich struktura, dráhy, kterých se účastní a mutace. Dále se literární rešerše zaměřila zejména na metodu sekvenování nové generace. Byl popsán princip, výhody a nevýhody metody, a dále systém klasifikace nalezených variant.

V praktické části byly hodnoceny varianty neznámého významu získané sekvenováním 27 genů u 815 pacientů s podezřením na hereditární nádorové onemocnění. Celkem bylo vyfiltrováno 164 variant nejasného významu., které byly porovnány s A-C-G-T databází. Následně byly alelické frekvence identifikovaných variant porovnány s alelickými frekvencemi nefínské evropské populace v celosvětové databázi gnomAD. Cílem byla správná klasifikace nalezených variant, popřípadě jejich reklasifikace, která by napomohla určení správné diagnózy, léčby, monitoringu a prevenci hereditárních nádorových onemocnění.

11. CITACE

1. Adzhubei, Ivan, Daniel M. Jordan, and Shamil R. Sunyaev. 2013. "Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2". *Current Protocols in Human Genetics* 76 (1).
<https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>.
2. Aerts, J., W. Wynendaele, R. Paridaens, M.-R. Christiaens, W. van den Bogaert, A.T. van Oosterom, and F. Vandekerckhove. 2001. "A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood". *Annals of Oncology* 12 (1): 39-46.
<https://doi.org/10.1023/A:1008317512253>.
3. Ahn, Jinwoo, Marshall Urist, and Carol Prives. 2004. "The Chk2 protein kinase". *DNA Repair* 3 (8-9): 1039-1047. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.033>.
4. Antoni, Laurent, Nayanta Sodha, Ian Collins, and Michelle D. Garrett. 2007. "CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy – two sides of the same coin?". *Nature Reviews Cancer* 7 (12): 925-936. <https://doi.org/10.1038/nrc2251>.
5. Badache, Ali, and Anthony Gonçalves. 2006. "The ErbB2 Signaling Network as a Target for Breast Cancer Therapy". : 13. <file:///C:/Users/42060/Downloads/s10911-006-9009-1.pdf>.
6. Barroso-sousa, Romualdo, Iuri A. Santana, Laura Testa, Débora de Melo Gagliato, and Max S. Mano. 2013. "Biological therapies in breast cancer: Common toxicities and management strategies". *The Breast* 22 (6): 1009-1018.
<https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.09.009>.
7. Bartek, Jiri, and Jiri Lukas. 2003. "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer". *Cancer Cell* 3 (5): 421-429. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00110-7).
8. Bartek, Jiri, and Jiri Lukas. 2003. "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer". *Cancer Cell* 3 (5): 421-429. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00110-7).
9. Behjati, Sam, and Patrick S Tarpey. 2013. "What is next generation sequencing?". *Archives of disease in childhood - Education & practice edition* 98 (6): 236-238.
<https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>.
10. Beránek, Martin. 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. 1st ed. Vol. 00001. Paha: Karolinum.

11. Berardinelli, Francesco, Alessandra Masi, and Antonio Antocchia. 2013. "NBN Gene Polymorphisms and Cancer Susceptibility: A Systemic Review". *Current Genomics* 14 (7): 425-440. <https://doi.org/10.2174/13892029113146660012>.
12. Boonen, Rick A. C. M., Amélie Rodrigue, Chantal Stoepker, Wouter W. Wiegant, Bas Vroeling, Milan Sharma, Magdalena B. Rother, et al. 2023. "Human PALB2 variants and their effect on HR". *Nature Communications*. <https://www.nature.com/articles/s41467-019-13194-2>.
13. Brzovic, Peter s., Jennifer R. Keefe, Hiroyuki Nishikawa, Keiko Miyamoto, David Fox III, Mamoru Fukuda, Tomohiko Ohta, and Rachel Kleivi. 2003. "Binding and recognition in the assembly of an activeBRCA1_x0001_BARD1 ubiquitin-ligase complex". *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES* 100 (10): 46-51. <https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.0836054100>.
14. Büchler, Tomáš, and Jana Čejková. 2015. "Přehled biologické léčby HER2-pozitivního metastatického karcinomu prsu". *Klinická farmakologie a farmacie* 29 (1): 8-12. https://www.klinickafarmakologie.cz/artkey/far-201501-0003_Prehled_biologicke_lecby_HER2-pozitivniho_metastatickeho_karcinomu_prsu.php.
15. Cai, Zhenjian, Nabil H. Chehab, and Nikola P. Pavletich. 2009. "Structure and Activation Mechanism of the CHK2 DNA Damage Checkpoint Kinase". *Molecular Cell* 35 (6): 818-829. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.007>.
16. Cai, Zhenjian, Nabil H. Chehab, and Nikola P. Pavletich. 2023. "Structure of the CHK2K249R Dimer". *Molecular Cell*. [https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765\(09\)00635-2](https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765(09)00635-2).
17. Clark, Serena L., Ana M. Rodriguez, Russell R. Snyder, Gary D.V. Hankins, and Darren Boehning. 2012. "STRUCTURE-FUNCTION OF THE TUMOR SUPPRESSOR BRCA1". *Computational and Structural Biotechnology Journal* 1 (1). <https://doi.org/10.5936/csbj.201204005>.
18. Cline, Melissa S., Rachel G. Liao, Michael T. Parsons, Benedict Paten, Faisal Alquaddoomi, Antonis Antoniou, Samantha Baxter, et al. 2018. "BRCA Challenge: BRCA Exchange as a global resource for variants in BRCA1 and BRCA2". *PLOS Genetics* 14 (12): 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007752>.
19. Coufal, Oldřich, and Vuk Fait. 2011. *Chirurgická léčba karcinomu prsu*. Praha: Grada.

20. Coufal, O., M. Schneiderová, K. Petránková, I. Babánková, and I. Selingerová. 2017. "Magnetická rezonance v předoperační diagnostice invazivních lobulárních karcinomů prsu - analýza 230 případů". *Surgical Review / Rozhledy v Chirurgii* 96 (8): 340-345.
<https://eds.s.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=bf4ed71f-85fd-4965-8a70-909ca28257e3%40redis>.
21. Desmedt, Christine, Thierry Voet, Christos Sotiriou, and Peter J. Campbell. 2012. "Next-generation sequencing in breast cancer". *Current Opinion in Oncology* 24 (6): 597-604. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e328359554e>.
22. DMLapato. 2023. "Cluster_Generation". Wikipedia.
https://en.wikipedia.org/wiki/Illumina_dye_sequencing#/media/File:Cluster_Generation.png.
23. Doležalová, Lenka. 2015. "Cílená léčba v onkologii". *Praktické lékařství* 11 (6). praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2015/06/03.pdf.
24. Ducy, Mandy, Laura Sesma-Sanz, Laure Guitton-Sert, Anahita Lashgari, Yuandi Gao, Nadine Brahiti, Amélie Rodrigue, et al. 2019. "The Tumor Suppressor PALB2: Inside Out". *Trends in Biochemical Sciences* 44 (3): 226-240.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.10.008>.
25. Dudová, S., and R. Hájek. 2008. "VYUŽITÍ METODY REAL-TIME PCR (KVANTITATIVNÍ PCR, PCR V REÁLNÉM ČASE) V HEMATOLOGII A STUDIU MNOHOČETNÉHO MYELOMU". *Klinická onkologie* 21 (1): 220-221.
<https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/144/3337.pdf>.
26. Ellmann, Stephan, Heinrich Sticht, Falk Thiel, Matthias W. Beckmann, Reiner Strick, and Pamela L. Strissel. 2009. "Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets". *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (15): 2405-2426. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0017-3>.
27. Fischer, Uwe, Friedemann Baum, and Susanne Luftner-Nagel. 2017. *Breast Cancer: Diagnostic Imaging and Therapeutic Guidance*. 1st ed. Stuttgart: Theime.
<https://web.s.ebscohost.com/ehost/ebookviewer/ebook/bmxlYmtfXzE2MDc0ODlfX0FO0?sid=94538d82-8b87-422b-95e9-fb7bf8a66971%40redis&vid=0&format=EB&rid=1>.
28. Foretová, Lenka, Marie Navrátilová, Marek Svoboda, Petra Vašíčková, Eva Šťahlová Hrabíková, Jana Házová, Petra Kleiblová, et al. 2019. "Doporučení pro sledování žen

- se vzácnějšími genetickými příčinami nádoru prsu a ovarií”. *Klinická onkologie* 32 (2): 9-13. file:///C:/Users/42060/Downloads/KO%202021%20(3).pdf.
29. Foretová, Lucie, Eva Macháčková, Markéta Palácová, Marie Navrátilová, Marek Svoboda, and Katarína Petráková. 2016. “Doporučení rozšíření indikačních kritérií ke genetickému testování mutací v genech BRCA1 a BRCA2 u hereditárního syndromu nádorů prsu a ovarií”. *Klinická onkologie* 29 (1): 9-13. <https://eds.p.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=0eec2239-fb22-4442-8970-6ec6fcc7fae7%40redis>.
 30. Fradet-turcotte, Amelie, Justine Sitz, Damien Grapton, and Alexandre Orthwein. 2016. “BRCA2 functions: from DNA repair to replication fork stabilization”. *ENDOCRINE-RELATED CANCER* 23 (10): T1. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0297>.
 31. Fumarola, Claudia. 2017. “Endocrine Therapy in Breast Cancer”. In *Encyklope of cancer* 1st ed., 1501-1506. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-662-46875-3_7152.
 32. Fu, Xiaoyu, Wei Tan, Huadong Pei, and Juanjuan Li. 2023. “The domain structure of BRCA1”. *Forniters*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.813457/full>.
 33. Gao, Xiuhua, and Zafar Nawaz. 2002. “Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer: Role of steroid receptor coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer”. *Breast Cancer Research* 4 (5). <https://doi.org/10.1186/bcr449>.
 34. Garret, A., S. Allen, L. Loong, M. Durkie, J. Drummond, G.J Burghel, R. Robinson, et al. 2022. “CanVIG-UK Consensus Specification for Cancer Susceptibility Genes (CSGs) of ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification”. *Can-Vig UK*: 1-20. https://www.cangene-canvaruk.org/_files/ugd/ed948a_4ee76eb554ef4b3c9f281cc7fb55c217.pdf.
 35. Germani, Aldo, Daniele Guadagnolo, Valentina Salvati, Caterina Micolonghi, Rita Mancini, Gioia Mastromoro, Soha Sadeghi, Simona Petrucci, Antonio Pizzuti, and Maria Piane. 2022. “Genomic Breakpoints' Characterization of a Large CHEK2 Duplication in an Italian Family with Hereditary Breast Cancer”. *Diagnostics* (2075-4418) 12 (7): N.PAG. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12071520>.
 36. Gurbachan, S. Miglan. 2014. *Gene expression*. 1st ed. Oxford: Alpha Science International.

- <https://web.p.ebscohost.com/ehost/ebookviewer/ebook/bmxlYmtfXzE3NTI3NTfhX0FO0?sid=36cfe671-a13b-4c23-800b-ecc5edac9f07%40redis&vid=14&format=EB&rid=1>.
37. Hamdan, Omar, and Klaudia M Nowak. 2023. "Gene of the month: PALB2". *Journal of Clinical Pathology* 76 (2): 73-75. <https://doi.org/10.1136/jcp-2022-208461>
38. Heczková, M., E. Macháčková, M. Jirsa, J. Špičák, L. Foretová, and T. Hucl. 2012. "Hodnocení variant nejasného významu v genu BRCA2". *Klinická onkologie* 25 (1): 87-95. <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/172/4076.pdf>.
39. Henderson, Maureen M., Laneta J. Dorflinger, Jack Fishman, Henry W. Foster jr., Frank E. Gump, Samuel Hellman, Barbara S. Hulka, et al. 1991. *Oral Contraceptives and breast cancer*. 9 ed. Washington D.C.: NATIONAL ACADEMY PRESS. <https://eds.p.ebscohost.com/eds/ebookviewer/ebook/bmxlYmtfXzE0NDg1X19BTg2?sid=55fe550d-abf3-4f28-8a64-dda2f015ac33%40redis&vid=2&format=EB&rid=1>.
40. Hesketh, Robin. 1997. *The Oncogene and Tumour Suppressor Gene Factsbook*. 2nd ed. San Diego, Calif: Academic Press. <https://web.p.ebscohost.com/ehost/ebookviewer/ebook/bmxlYmtfXzIzMDg1MV9fQU41?sid=5fef40b1-5e92-46b3-99d6-0542a48a8a6d@redis&vid=4&format=EB&rid=1>.
41. Holánek, M., O. Bílek, R. Neutil, T. Kazda, M. Zvaríková, M. Palácová, M. Krásenský, R. Vyzula, and K. Petráková. 2019. "Solen.cz/artkey/xon-201902-0004_imunoterapie_karcinomu_prsu.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3D%2BPsychofarmakologie%2Bv%2Bonkologii%252C%2Bmo%25BEnosti%2Bovlivn%25ECn%25ED%2Bbolest%26sfrom%3D1200%26spage%3D30". *Klinická onkologie* 32 (2): 31-35. <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/459/5578.pdf>.
42. Hruška, Libor, Igor Sirák, Jan Lace, Petra Fridrichová, Hana Nosková, Ondřej Slabý, Karol Pál, Veronika Bočková, Miroslav Hodek, and Jiří Petera. 2019. "Vzácný nález hereditární zátěže u mladé pacientky s hyperkalcemickým malobuněčným karcinomem hrdla dělohy". *Klinická onkologie* 32 (6): 56-62. <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2019-12-15-6/vzacny-nalez-hereditarni-zateze-u-mlade-pacientky-s-hyperkalcemickym-malobunecny/>.
43. Hudis, Clifford A. 2007. "Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice". *New England Journal of Medicine* 357 (1): 39-51. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043186>.

44. Chaya5260. 2001. "Recombinational repair of DNA double-strand damage - some key steps". Wikipedia.
https://en.wikipedia.org/wiki/BRCA2#/media/File:Homologous_recombinational_repair_of_DNA_double-strand_damage.jpg.
45. Chen, Yue, and Randy Y. C. Poon. 2008. "The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability". *FRONTIERS IN BIOSCIENCE* 13: 5016-5029.
46. Ching Yun Leung, Charles, and N.J. Mark Glover. 2011. "BRCT domains". *Cell Cycle* 10 (15): 2461-2470.
<https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.4161/cc.10.15.16312?scroll=top&needAccess=true&role=tab>.
47. Chung, Jacky K. H., and Meredith S. Irwin. 2017. *Encyclopedia of Cancer*. 1st ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46875-3_3923.
48. Iacocca, Michael A., Joana R. Chora, Alain Carrié, Tomáš Freiburger, Sarah E. Leigh, Joep C. Defesche, C. Lisa Kurtz, et al. 2018. "ClinVar database of global familial hypercholesterolemia-associated DNA variants". *Human Mutation* 39 (11): 1631-1640. <https://doi.org/10.1002/humu.23634>.
49. Janotová, M., M. Borecká, J. Soukupová, P. Kleiblová, J. Stříbrná, M. Vočka, P. Zemánková, et al. 2016. "PALB2 jako další kandidátní gen pro genetické testování u pacientů s hereditárním karcinomem prsu v České republice". *Klinická onkologie* 29 (1): 31-34. linkos.cz/files/klinicka-onkologie/409/4874.pdf.
50. Joyce, Catherine, Appaji Rayi, and Anup Kasi. 2023. "Tumor-Suppressor Genes". StarPear.
51. Karczewski, Konrad J., Laurent C. Francioli, Grace Tiao, Beryl B. Cummings, Jessica Alföldi, Qingbo Wang, Ryan L. Collins, et al. 2021. "Author Correction: The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans". *Nature* 590 (7846): E53-E53. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03174-8>.
52. Kinzler, Kenneth W., and Bert Vogelstein. 1997. "Gatekeepers and caretakers". *Nature* 386 (6627): 761-763. <https://doi.org/10.1038/386761a0>.
53. Kiss, Igor, Radim Němeček, Michal Doubek, and Rostislav Vyzula. 2021. *KLINICKÁ ONKOLOGIE PRO MEDIKY: Solidní nádory, nádory dětského věku a hematologické malignity*. 3rd ed. Brno: Masarykova Univerzita.
<file:///C:/Users/42060/Downloads/klinicka-onkologie-pro-mediky-2021.pdf>.

54. Kleibl, Zdeněk. 2016. "Sekvenování nové generace – nová generace diagnostiky dědičných nádorových syndromů". *Labor Aktuel* 20 (2): 21-24.
file:///C:/Users/42060/Downloads/la216.pdf.
55. Klener, Petr. 2013. "Cílená léčiva a jejich přínos pro terapii vnitřních chorob". *Vnitřní lékařství* 59 (1): 5-12.
<http://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2013/01/01.pdf>.
56. Koudová, M., and A. Puchmajero. 2019. "Rizika solidních nádorů u heterozygotních přenašečů recesivních syndromů". *Klinická onkologie* 32 (2): 14-23.
<https://www.linkos.cz/english-summary/klinicka-onkologie-journal/2019-08-18-supplementum-2-en/rizika-solidnich-nadoru-u-heterozygotnich-prenasecu-recesivnich-syndromu-risks-o-1/>.
57. Kübelbeck, Armin. 2001. "File:BRCA1 en.png". Wikimedia Commons.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:BRCA1_en.png.
58. Lukešová, Šárka, and Otakar Kopecký. 2014. "Praktické aspekty hormonální léčby karcinomu prsu". *Klinická farmakologie a farmacie* 28 (3): 120-124.
<https://www.solen.cz/pdfs/far/2014/03/09.pdf>.
59. Magnani, Luca, and Darren K. Patten. 2017. In *Breast Cancer: Innovations in Research and Management* 1st ed., 19-26. Switzerland: Springer Nature.
file:///C:/Users/42060/Downloads/978-3-319-48848-6%20(1).pdf.
60. Macháčková, Eva. 2022. "Nomenklatura, databáze lidského genomu a hodnocení nálezů". In *Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi*, Lenka Foretová, Eva Macháčková, and Renata Gaillyová 1st ed., 87-97. Praha: Grada Publishing.
61. Meijers-Heijboer, H., A.V.D. van den Ouweland, J. Klijn, M. Wasielewski, A. de Snoo, R. Oldenburg, A. Hollestelle, et al. 2002. "Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2*1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations". *Nature Genetics* 31 (1): 55-59. <https://doi.org/10.1038/ng879>.
62. Moasser, M M. 2007. "The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis". *Oncogene* 26 (45): 6469-6487.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477>.
63. Mohammed, Hisham, I. Alasdair Russell, Rory Stark, Oscar M. Rueda, Theresa E. Hickey, Gerard A. Tarulli, Aurelien A. Serandour, et al. 2015. "Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer". *Nature* 523 (7560): 313-317.
<https://doi.org/10.1038/nature14583>.

64. Mohini Joshi, Mohini, and J.D Deshpande. 2011. "POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION". *International Journal of Biomedical Research* 2 (1): 81-89.
65. Mullan, P. B., J.E. Quinn, and D.P. Harkin. 2006. "The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control". *Oncogene* 25 (43): 5854-5863. <https://eds.p.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=3&sid=a90dda11-e413-4234-868a-5917c7e25ff1%40redis>.
66. Mylavarapu, Sanghamitra, Asmita Das, and Monideepa Roy. 2023. "BRCA1 is at the hub of numerous interconnecting cellular pathways". *Frontiers in Oncology*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00016/full>.
67. Mylavarapu, Sanghamitra, Asmita Das, and Monideepa Roy. 2018. "Role of BRCA Mutations in the Modulation of Response to Platinum Therapy". *Frontiers in Oncology* 8 (February). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00016>.
68. Myszk, Aleksander, Tu Nguyen-Dumont, Pawel Karpinski, Maria M. Sasiadek, Hayane Akopyan, Fleur Hammet, Helen Tsimiklis, et al. 2018. "Targeted massively parallel sequencing characterises the mutation spectrum of PALB2 in breast and ovarian cancer cases from Poland and Ukraine". *Familial Cancer* 17 (3): 345-349. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10689-017-0050-6>.
69. Nepomuceno, Thales, Giuliana De Gregoriis, Francisco M. Bastos de Oliveira, Guilherme Suarez-Kurtz, Alvaro Monteiro, and Marcelo Carvalho. 2017. "The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition". *International Journal of Molecular Sciences* 18 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091886>.
70. Otová, Berta, Romana Mihalová, and Klára Bobková. 2021. *Základy biologie a genetiky člověka*. 2nd ed. Praha: Karolinum.
71. Palácová, Markéta. 2019. "File:///C:/Users/42060/Downloads/KO%202021%20(3).pdf". *Klinická onkologie* 32 (2): 24-30. [file:///C:/Users/42060/Downloads/KO%202021%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/42060/Downloads/KO%202021%20(3).pdf).
72. Pellegrine, Luca, and Ashok Venritaraman. 2004. "Emerging functions of BRCA2 in DNA recombination". *RENDS in Biochemical Sciences* 26 (6): 310-316. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0968000404001021?token=BC80B80E24F657C50D038027CA78654DE6802D7AECC7F9BEF0DDA276BB1CB5464A41A786D6EF99A5928B2FBC694F1CF1&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230305101800>.

73. Petráková, Katarína, and Rostislav Vyzula. 2018. "O nádorech prsu". Linkos - Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně. <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/nadory-prsu-c50/o-nadorech-prsu/>.
74. Petráková, K., M. Palácová, M. Schneiderová, and M. Standara. 2016. "Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií". *Klinická onkologie* 29 (1): 14-21. <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/200/4869.pdf>.
75. Phuong Le, Hang, Wolf-Dietrich Heyer, and Jie Liu. 2012. "Guardians of the Genome: BRCA2 and Its Partners". *Genes* 12 (8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8394001/>.
76. Puchmajerová, Alena, Jannis Tornikidis, Lubor Mrňa, Markéta Havlovicová, Markéta Vlčková, Jana Chrudimská, Milan Macek jr, and Jiří Hoch. 2018. "Hereditární formy karcinomu prsu: genetická etiologie a současné možnosti prevence a chirurgické léčby". *ČASOPIS LÉKARŮ ČESKÝCH* 157 (2): 90-95. <file:///C:/Users/42060/Desktop/bakal%C3%A1%C5%99ka/ContentServer.pdf>.
77. Ramus, Susan J., Honglin Song, Ed Dicks, Jonathan P. Tyrer, Adam N. Rosenthal, Maria P. Intermaggio, Lindsay Fraser, et al. 2015. "Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer". *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 107 (11). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv214>.
78. Richards, Sue, Nazneen Aziz, Sherri Bale, David Bick, Soma Das, Julie Gastier-Foster, Wayne W. Grody, et al. 2015. "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". *Genetics in Medicine* 17 (5): 405-424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
79. Rosen, Eliot M., Saijun Fan, Richard G. Pestell, and Itzhak D. Goldberg. 2003. "BRCA1 gene in breast cancer". *Journal of Cellular Physiology* 196 (1): 19-41. <https://doi.org/10.1002/jcp.10257>.
80. Roy, R., J. Chun, and S. N. Powell. 2011. "BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection". *Nature reviews. Cancer* 12 (1): 68-78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>.
81. Roy, Rohini, Jarin Chun, and Simon n. Powell. 2012. "BRCA1 and BRCA2: Important differences with common interests". *Nature reviews. Cancer* 12 (5): 68-78.

- https://www.researchgate.net/publication/224824106_BRCA1_and_BRCA2_Important_differences_with_common_interests.
82. Ryška, Aleš. 2010. "Histologické vyšetření karcinomu prsu". Linkos - Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně.
<https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/nadory-prsu-c50/histologicke-vysetreni-karcinomu-prsu/#:~:text=Kombinac%C3%AD%20obou%20v%C3%BD%C5%A1e%20zm%C3%ADn%C4%9Bn%C3%BDch%20krit%C3%A9ri%C3%AD%20pak%20lze%20rozli%C5%A1it,lobul%C3%A1rn%C3%AD%20invazivn%C3%AD%20karcinom%20%28asi%2010-15%25%20v%C5%A1ech%20invazivn%C3%ADch%20karcinom%C5%AF%29>.
83. Ryška, Aleš, Eva Hovorková, Folakemi Sobande, Tomáš Rozkoš, Jan Laco, and Helena Hornychová. 2015. "Naděje a úskalí molekulární klasifikace karcinomu prsu". *Czecho-Slovak Pathology* 51 (1): 26-32.
<https://eds.p.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=9&sid=67ca63f4-2742-405c-95aa-f728e6afa487%40redis>.
84. Sellner, Loryn N., and Graham R. Taylor. 2004. "MLPA and MAPH: New techniques for detection of gene deletions". *Human Mutation* 23 (5): 413-419.
<https://doi.org/10.1002/humu.20035>.
85. Shailani, Anjali, Raman Preet Kaur Gill, and Anjan Munshi. 2023. "Struktura BRCA2 a její motivy pro interakci s různými proteiny". Research gate.
https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-BRCA2-and-its-motifs-for-the-interaction-with-various-proteins_fig1_322843068.
86. Shailani, Anjali, Raman Preet Kaur, and Anjana Munshi. 2018. "A comprehensive analysis of BRCA2 gene: focus on mechanistic aspects of its functions, spectrum of deleterious mutations, and therapeutic strategies targeting BRCA2 deficient tumors". *Medical Oncologi* 35 (18).
<https://www.proquest.com/docview/1993596931/7D2B054282EA4B7APQ/1?accountid=16730>.
87. Shampoo, Yousif. 2003. "Structural insights into BRCA2 function". *Current Opinion in Structural Biology* 13 (2): 206-2011.
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0959440X03000332?token=39A527C05ED1E819034C08607562634E5A1E785B0AAD9FDCA39F805A02D929C77D1ACA>

7C36B3780F297ADC067C92FE09&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230304222427.

88. Sharma, Babita, Raman Preet Kaur, Sonali Raut, and Anja Munshi. 2018. "BRCA1 mutation spectrum, functions, and therapeutic strategies: The story so far". *Current Problems in Cancer* 42 (2): 189-207.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147027217301563>.
89. Slabý, Ondřej. 2008. "Technologie sekvenování nové generace: celogenomové, celoexomové a cílené – hotspot – sekvenování". *Prolékaře.cz*.
<https://www.prolekare.cz/tema/precizni-medicina/detail/technologie-sekvenovani-nove-generace-celogenomove-celoexomove-a-cilene-hotspot-sekvenovani-105628>.
90. Slabý, Ondřej. 2019. "Technologie sekvenování nové generace: celogenomové, celoexomové a cílené – hotspot – sekvenování". *Prolékaře.cz*, no. 1: 34-38.
<https://www.prolekare.cz/casopisy/oborovy-special/2019-1-onkologie-rozsirenaverze/technologie-sekvenovani-nove-generace-celogenomove-celoexomove-a-cilene-hotspot-sekvenovani-107698>.
91. Slobodníková, Jana, and Zdenka Krajčovičová. 2012. "BI-RADS klasifikácia v mamografii – najčastejšie diskrepancie a odporúčania pre prax". *Onkológia* 7 (6): 402-404.
<https://www.solen.sk/storage/file/article/9bcff3cfa9ee425de6b8154e2ed10229.pdf>.
92. Sokolenko, Anna P., and Evgeny N. Imyanitov. 2018. "Molecular Diagnostics in Clinical Oncology". *Frontiers in Molecular Biosciences* 5 (August).
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00076>.
93. Soukupová, Jana. 2016. "Úskalí interpretace sekvenačních dat v diagnostice dědičných nádorových syndromů". *Labor Aktuell* 20 (4): 23-26.
<file:///C:/Users/42060/Downloads/la416.pdf>.
94. Southey, Melissa, Zhi L Teo, and Ingrid Winship. 2013. "PALB2 and breast cancer: ready for clinical translation!". *The Application of Clinical Genetics* 6 (1): 43-51.
<https://doi.org/10.2147/TACG.S34116>.
95. Stáhalová, Vladimíra. 2008. *Léčba zářením a vy.* 1st ed. Praha: Liga proti rakovině.
96. Staněk, Libor. 2021. "Molekulární klasifikace a význam exprese HER-3 receptoru u karcinomu prsu". *SYNLABIANER* 29 (1): 7-11.
<https://synlabianer.cz/nezarazene/molekularni-klasifikace-a-vyznam-exprese-her-3-receptoru-u-karcinomu-prsu/>.

97. Stenson, Peter D., Matthew Mort, Edward V. Ball, Molly Chapman, Katy Evans, Luisa Azevedo, Matthew Hayden, et al. 2020. "The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting". *Human Genetics* 139 (10): 1197-1207. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02199-3>.
98. Stolarova, Lenka, Petra Kleiblova, Marketa Janatova, Jana Soukupova, Petra Zemankova, Libor Macurek, and Zdenek Kleibl. 2020. "CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate". *Cells (2073-4409)* 9 (12): 2675-2675. <https://doi.org/10.3390/cells9122675>.
99. Stuppia, Liborio, Ivana Antonucci, Giandomenico Palka, and Valentina Gatta. 2012. "Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases". *International Journal of Molecular Sciences* 13 (3): 3245-3276. <https://doi.org/10.3390/ijms13033245>.
100. Šípek jr., Antoním. 2014. "Hereditární nádorové syndromy". *Genetika-Biologie*. <http://www.genetika-biologie.cz/hereditarni-nadorove-syndromy>.
101. Takaoka, Miho, and Yoshio Miki. 2018. "BRCA1 gene: function and deficiency". *International Journal of Clinical Oncology* 23 (1): 36-44. <http://link.springer.com/10.1007/s10147-017-1182-2>.
102. Tischkowitz, Marc, and Bing Xia. 2010. "PALB2/FANCN: Recombining Cancer and Fanconi Anemia". *Cancer Research* 70 (19): 7353-7359. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1012>.
103. Voelkerding, Karl V., Shale Dames, and Jacob D. Durtschi. 2010. "Next Generation Sequencing for Clinical Diagnostics-Principles and Application to Targeted Resequencing for Hypertrophic Cardiomyopathy". *The Journal of Molecular Diagnostics* 12 (5): 539-551. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.100043>.
104. Vojtěšek, B., A. Krejčí, and P. Müller. 2015. "Bioinformatika a sekvenování nové generace". *Klinická onkologie* 28 (2): 91-96. linkos.cz/files/klinicka-onkologie/196.pdf#page=91.
105. Vojtěšek, B., L. Kubková, and R. Vyzula. 2014. "Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi". *Klinická onkologie* 27 (1): 61-68. <file:///C:/Users/42060/Desktop/bakal%C3%A1%C5%99ka/NGS%20rozd%C4%9Blen%C3%AD.pdf>.
106. Voňka, P., and R. Hrstka. 2019. "Souhrné aktuálních poznatků o úloze setrogenového receptoru α v nádorové buněčné signalizaci". *Klinická onkologie* 33 (4): 34-38. <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/461/5607.pdf>.

107. Wang, Li-Hui, Chun-Fu Wu, Nirmal Rajasekaran, and Young Kee Shin. 2019. "Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview". *Cellular Physiology and Biochemistry* 51 (6): 2647-2693. <https://doi.org/10.1159/000495956>.
108. Wienberg, Vit, Luboš Mynář, and Dagmar Brančíková. 2012. "Moderní chirurgická a biologická léčba karcinomu prsu". *Česká gynekologie* 77 (6): 513-520. <https://eds.s.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=24a435b9-0b80-4e59-a6a2-7b20acd32fd1%40redis>.
109. Yun, Jun, Yang Li, Chang-Tai Xu, and Bo-Rong Pan. 2011. "Epidemiology and Rb1 gene of retinoblastoma". *International Journal of Ophthalmology* 4 (1): 103-109. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3340672/pdf/ijo-04-01-103.pdf>.
110. Zhang, Feng, Jianglin Ma, Jiaxue Wu, Lin Ye, Hong Cai, Bing Xia, and Xiaochun Yu. 2009. "PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response". *Current Biology* 19 (6): 524-529. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.018>.
111. Zhang, Ying, Junqing Zhou, and Chang UK Lim. 2006. "The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control". *Cell Research* 16 (1): 45-54. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310007>.
112. Zhou, Xuedong, and Li Yuqing. 2023. "Illumina sequencing". ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/illumina-dye-sequencing>.
113. "Polymerázová řetězová reakce". 2023. Biogen. <https://biogen.cz/polymerazova-retezova-reakce>.
114. "Leiden Open Variation Database". 2001-. Wikipedia: the free encyclopedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Leiden_Open_Variation_Database.
115. "InSiGHT variants databases". InSight. <https://www.insight-group.org/variants/databases/>.
116. "MutationTaster". 2023. Wikipedia: the free encyclopedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/MutationTaster>.
117. "Breast Cancer: Types of Treatment". 2002. Cancer.net. <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/types-treatment>.
118. "Diagnostika karcinomu prsu". 2018. Euc. <https://euc.cz/clanky-a-novinky/clanky/diagnostika-karcinomu-prsu/>.

119. "ClinVar: What is ClinVar". National library of medicine.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/>.
120. "Analýza českých genomů pro teranostiku". 2020. CITEC. <https://www.A-C-G-T.cz/>.