



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Detekce mutací a intragenových přestaveb v genech
BRCA1 a *BRCA2* pomocí sekvenování a metody MLPA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ZDRAVOTNÍ
LABORANT**

Autor: Kristýna Pechová

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „**Detekce mutací a intragenových přestaveb v genech *BRCA1* a *BRCA2* pomocí sekvenování a metody MLPA**“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. 5. 2020

.....
Kristýna Pechová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce, Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D., za jeho trpělivost, odborné konzultace, ale také za ochotu a čas, který mi věnoval během psaní mé práce. Velké poděkování patří i Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity za možnost provést praktickou část ve školní laboratoři. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině a příteli za jejich trpělivost a podporu.

Detekce mutací a intragenových přestaveb v genech *BRCA1* a *BRCA2* pomocí sekvenování a metody MLPA

Abstrakt

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala detekcí mutací v *BRCA* genech a jejich vlivem na vznik karcinomu prsu. Toto téma je v dnešní době velice důležité, protože právě karcinomy prsu jsou nejčastějším nádorovým onemocněním u žen v České republice (Weinberger a Zikán, 2016).

V teoretické části jsem se zaměřila na karcinom prsu, především na jeho diagnostiku a následnou léčbu. Dále jsem se věnovala genetickému poradenství a vyšetření, které je pro diagnostiku dědičných forem karcinomů velmi důležité. Uvedla jsem základní informace týkající se *BRCA* genů a jejich bílkovinných produktů a shrnula jsem problematiku mutací v těchto genech a jejich souvislost s nádorovým onemocněním, zejména prsu a ovária.

V praktické části jsem se věnovala vyšetření vybraných oblastí *BRCA* genů metodou Sangerova sekvenování. Dnes se *BRCA* geny vyšetřují metodou NGS, protože umožňuje prohlédnout všechny exony daného genu najednou, ale toto testování nebylo v mých laboratorních podmínkách možné provést, proto jsem zvolila metodu Sangerova sekvenování, která má však určitá kapacitní omezení. Pomocí metody PCR jsem připravila vzorky pro Sangerovo sekvenování, které následně provedla firma Genseq s.r.o.

V poslední části své práce jsem zpracovala získané sekvence a provedla vyhodnocení výsledků. Sekvenační metodou jsem nechala vyšetřit celkem 20 anonymizovaných vzorků, z toho byla mutace přítomna u 4 vzorků – jedna byla patogenní, jedna benigní a dvě s nejasným významem.

Klíčová slova

BRCA1; *BRCA2*; karcinom prsu; Sangerovo sekvenování; genetické testování; MLPA

Detection of mutations and intragenic rearrangements in *BRCA1* and *BRCA2* genes by sequencing and MLPA method

Abstract

In my bachelor thesis I dealt with the detection of mutations in *BRCA* genes and their effect on the development of breast cancer. Nowadays, this topic is very important, because breast cancer is the most common cancer among women in the Czech Republic (Weinberger a Zikán, 2016).

In the theoretical part I focused on breast cancer, particularly on its diagnosis and consequent treatment. I also dedicated genetic counselling and examination, which is very important for the diagnosis of hereditary forms of cancer. I mentioned basic information about *BRCA* genes, and their protein products and I summarized the issue of mutations in these genes and their relationship to cancer, particularly breast and ovarian.

In the practical part, I focused on the examination of selected areas of *BRCA* genes by the Sanger sequencing method. At present, *BRCA* genes are examined by the NGS method, because it allows for the analysis of all exons of one particular gene at once, but this testing wasn't possible to realize in my laboratory conditions, therefore I have chosen the method of Sanger sequencing, which does, however, have certain capacity limitations. By using the PCR method, I prepared samples for testing by Sanger sequencing. This testing was conducted by the firm Genseq s.r.o.

In the last part of my thesis I processed the obtained sequences and I evaluated the results. I examined a total of 20 anonymized samples using the sequencing method. Mutation was present in 4 samples of the total amount - one was pathogenic, one benign and two of uncertain significance.

Key words

BRCA1; *BRCA2*; breast cancer; Sanger sequencing; genetic testing; MLPA

Obsah

1	Nádorová onemocnění.....	9
1.1	Sporadická nádorová onemocnění	10
1.2	Hereditární nádorová onemocnění	10
1.3	Familiární nádorová onemocnění.....	11
2	Karcinom prsu	12
2.1	Příznaky karcinomu prsu.....	13
2.2	Rizikové faktory karcinomu prsu.....	13
2.3	Diagnostika a vyšetření při podezření na karcinom prsu	14
2.3.1	Histologické vyšetření.....	14
2.3.2	Zobrazovací metody	15
2.3.3	Biochemické vyšetření	15
2.3.4	Hematologické vyšetření.....	16
2.4	Léčba karcinomu prsu	16
2.4.1	Chirurgická terapie.....	17
2.4.2	Radioterapie	18
2.4.3	Chemoterapie	18
2.4.3.1	<i>Adjuvantní chemoterapie</i>	<i>19</i>
2.4.3.2	<i>Neoadjuvantní chemoterapie</i>	<i>19</i>
2.4.3.3	<i>Paliativní chemoterapie</i>	<i>19</i>
2.5	Rekonstrukce prsu po mastektomii	19
3	Genetické poradenství a diagnostika	21
3.1	Rodinná anamnéza	21
3.2	Genetické vyšetření.....	21
4	Geny s dědičnou predispozicí pro vznik nádorového onemocnění prsu	24
4.1	Geny s nízkou penetrancí.....	24
4.2	Geny se střední penetrancí	24
4.3	Geny s vysokou penetrancí	24
5	BRCA geny	25
5.1	Charakteristika genu <i>BRCA1</i>	25
5.2	Protein BRCA1	25
5.2.1	RING doména	26
5.2.2	Centrální oblast	27
5.2.3	BRCT domény	27
5.3	Charakteristika genu <i>BRCA2</i>	28
5.4	Protein BRCA2	28

5.5	Společná funkce proteinů BRCA1 a BRCA2	29
6	Mutace v <i>BRCA</i> genech.....	30
7	Cíle práce.....	31
8	Metodika.....	32
8.1	Odběr vzorků.....	32
8.2	Izolace DNA	32
8.3	Měření koncentrace vzorků DNA	33
8.4	PCR	34
8.5	Elektroforéza PCR produktů	35
8.6	Přečištění PCR produktů.....	37
8.7	Příprava na sekvenaci.....	37
8.8	Sangerovo sekvenování.....	38
8.9	MLPA.....	39
9	Výsledky	44
10	Diskuse.....	48
11	Závěr	50
12	Seznam použitých zdrojů.....	51
13	Seznam tabulek, grafů a obrázků	61
14	Seznam použitých zkratk	62

Úvod

Karcinomy vznikají v případě, že dojde k selhání kontrolních bodů v buňce (Chao et al., 2017). Většina karcinomů se v populaci vyskytuje sporadicky (Prausová, 2010). Hereditární nádorová onemocnění tvoří pouze 5–10 % a familiární forma se nachází u 10–15 % onkologických onemocnění (Bajčiová, 2015). V současné době je karcinom prsu jedním z nejčastěji se vyskytujících maligních nádorových onemocnění u žen (Weinberger a Zikán, 2016).

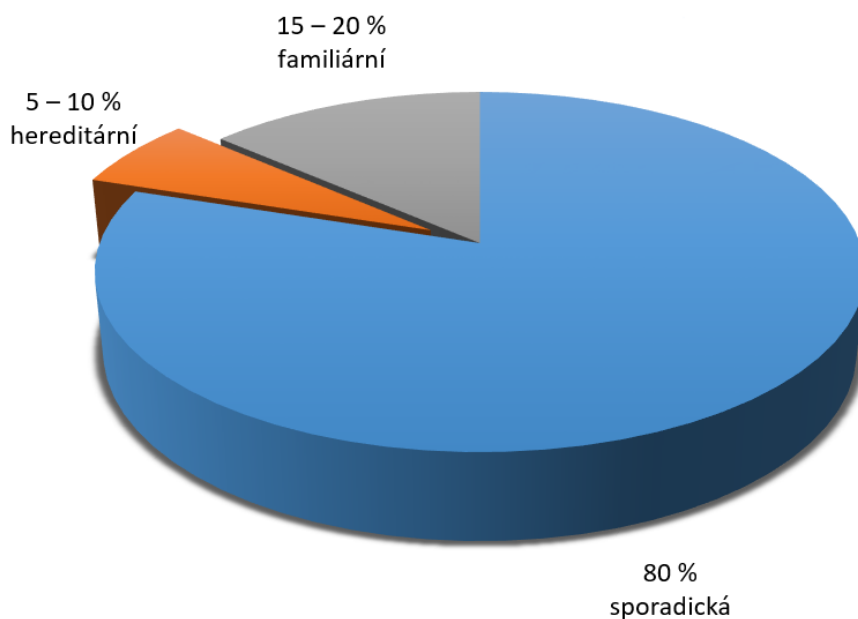
Dědičné karcinomy prsu jsou ve velké většině případů způsobeny mutací v jednom z predispozičních genů pro toto onemocnění. Rozlišujeme tři skupiny predispozičních genů, a to geny s nízkou, střední či vysokou penetrancí (Pohlreich et al., 2012). Nejvýznamnějšími geny s predispozicí ke vzniku karcinomu prsu jsou vysoce penetrantní geny *BRCA1* a *BRCA2* (Pohlreich et al., 2012; Zimovjanová, 2009), jejichž genetickou analýzou se ve své bakalářské práci budu zabývat. *BRCA1* a *BRCA2* geny mohou být predispoziční i pro další karcinomy, především ovarii, dále žlučníku a žlučových cest, kolorekta, pankreatu, ale také pro melanomy (Puchmajerová et al., 2018).

Geny *BRCA1* a *BRCA2* jsou velice rozsáhlé (Zimovjanová, 2009) a patří do skupiny tumor-supresorových genů (Foretová et al., 2016). Tyto geny produkují jaderné fosfoproteiny – proteiny BRCA1 a BRCA2, jejichž funkcí je podílení se na opravách dvouřetězcových zlomů DNA, ale také účast při regulaci buněčného cyklu (Zimovjanová, 2009). V případě postižení obou alel genu mutací dojde k vyřazení genu z funkce, což může vést k narušení stability genomu, následnému hromadění dalších mutací a ke vzniku nádorového onemocnění (Zimovjanová, 2009).

Mutace je v podstatě změna v genetické informaci (Foretová et al, 2009). V současnosti je možné provést genetické vyšetření mutací u pacientů s karcinomem prsu či ovaria nebo u pacientů zatížených rodinnou anamnézou (Foretová et al., 2016). Genetická testování zahrnují také vyšetření genů sekvenační metodou, pomocí které budu analyzovat vzorky ve své práci. Díky sekvenování lze zjistit o jakou konkrétní mutaci se jedná (Foretová et al, 2009). MLPA metoda se využívá k vyšetření intragenových přestaveb (Bunyan et al., 2004).

1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění patří stále mezi nejzávažnější choroby postihující stále větší část populace po celém světě. Tento problém je velice aktuální i v České republice, kde v průběhu života onemocní maligním nádorem každý třetí člověk a zemře každý čtvrtý (Prausová, 2010). Ke vzniku nádorového onemocnění dochází při selhání buněčných kontrolních bodů. Kontrolní body v buňce jsou důležité k objevení a následné reparaci změn v DNA a zároveň zabránit dělení buňky při jejím poškození (Foretová et al., 2014). Nádorová onemocnění rozlišujeme podle přítomnosti vzdálených metastáz na lokalizované a metastatické neboli diseminované. V případě lokalizovaného nádoru se vzdálené metastázy nevyskytují a má klinická stadia I-III. U metastatického nádorového onemocnění jsou přítomny vzdálené metastázy a jeho klinické stadium je IV (Coufal a Fait, 2011). Příčiny vzniku nádorových onemocnění mohou být různého původu a podle toho se pak dělí na karcinomy sporadické, hereditární či familiární (Prausová, 2010), jejichž zastoupení je znázorněno v grafu 1.



Graf 1. Zastoupení jednotlivých druhů nádorových onemocnění

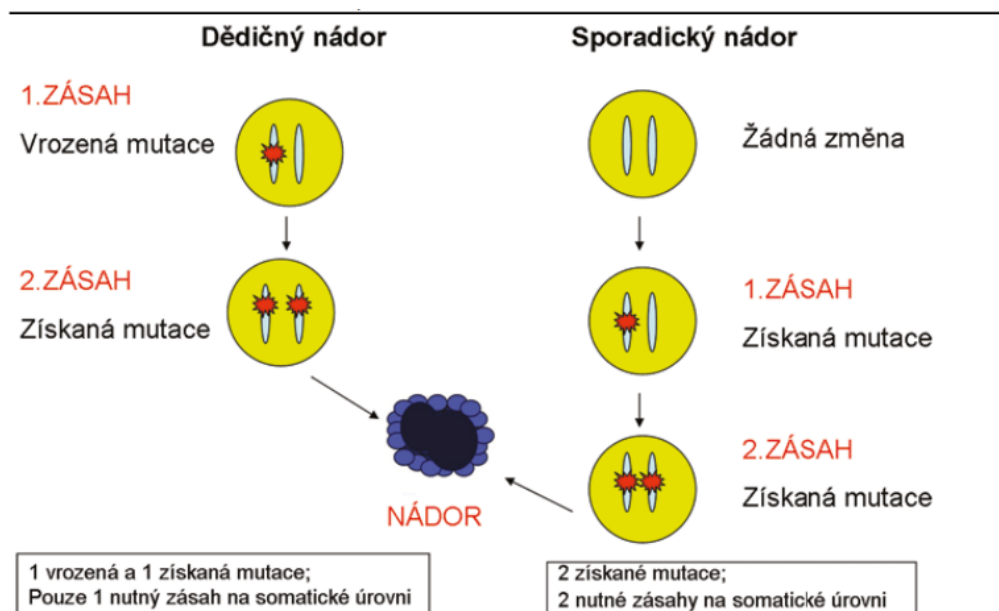
Zdroj: Nagy et al., 2004

1.1 Sporadická nádorová onemocnění

Sporadická nádorová onemocnění potřebují k propuknutí nádoru dvě získané somatické mutace. Vznik tohoto typu nádoru není zapříčiněn dědičnou dispozicí. Sporadické karcinomy tvoří přibližně 80 % všech nádorových onemocnění, takže výskyt nejčastějších druhů nádorů je převážně sporadický (Bajčiová, 2015).

1.2 Hereditární nádorová onemocnění

Vznik hereditárního nádorového onemocnění vysvětluje Knudsonova teorie dvojího zásahu, kde prvním zásahem je zděděná mutace alely příslušného genu a druhý zásah představuje získaná somatická mutace. Tuto teorii nelze použít pro všechny dědičné formy nádorů, protože na některé typy dědičných karcinomů nesedí. Od sporadického nádorového onemocnění se hereditární liší tím, že k propuknutí nádorového onemocnění je potřeba mít jednu vrozenou zárodečnou mutaci a jednu získanou mutaci. Zárodečná mutace se bude nacházet u každé buňky v těle. Vývoj obou typů karcinomů je jednoduše znázorněn na obrázku 1 (Bajčiová, 2015).



Obrázek 1. Vývoj hereditárního a sporadického nádoru

Zdroj: Bajčiová, 2015

Doposud bylo popsáno kolem 200 hereditárních nádorových predispozičních syndromů, které jsou spíše vzácné a tvoří přibližně 5-10 % všech nádorových onemocnění

(Nagy et al., 2004). Většina těchto hereditárních nádorových onemocnění se dědí autosomálně dominantně s neúplnou penetrancí. Autosomálně dominantní dědičnost znamená, že je mutovaná alela jednoho z genů přenášena z jedné generace na další (Puchmajerová et al., 2018).

Ačkoli tyto syndromy mají vysoké riziko vzniku maligního nádorového syndromu, tak mnohdy mají i predispozice ke vzniku benigních nádorů či generalizovaného onemocnění (Nagy et al., 2004).

Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií (HBOC) je jednou z nejčastějších forem dědičného nádoru prsu a ovaria, který je většinou následkem zárodečných mutací právě v *BRCA1* a *BRCA2* genech. Nositelky mutací *BRCA1* i *BRCA2* genů mají významně zvýšené riziko vzniku karcinomu po celý život a toto riziko je udáváno od 40 do 85 %. U 19 % nositelek mutace *BRCA1* genu a u 12 % nositelek mutace *BRCA2* genu dojde k rozvoji karcinomu prsu do věku 40 let. Riziko vzniku karcinomu ovaria u nositelek mutace *BRCA1* genu je 39-65 % a u žen nesoucích mutaci *BRCA2* genu se toto riziko nachází mezi 11-37 %. U mužů se nádor prsu objevuje velmi zřídka, spíše vzácně, ale u jedinců, kteří nosí mutaci genu *BRCA1*, dosahuje celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu přibližně 1 %. U mužských nositelů mutace *BRCA2* genu je toto riziko o něco vyšší, dosahuje hodnoty okolo 8 % (Puchmajerová et al., 2018). Nádory prsu u mužského pohlaví bývají ve většině případů hormonálně dependentní neboli závislé. Nádor prsu u mužů ovlivňuje jeden velice důležitý rizikový faktor, kterým je příjem estrogenů při špatné funkci jater nebo léčbě nádorového onemocnění prostaty (Prausová, 2010).

1.3 Familiární nádorová onemocnění

Familiární nádory jsou charakteristické zvýšeným výskytem zhoubných karcinomů v rodině, ale následné genetické vyšetření neprokázalo zárodečnou mutaci. Vznik tohoto typu nádoru může být spojen s interakcí genů s nízkou penetrancí, interakcí gen-prostředí nebo jejich kombinací. Familiární nádorová onemocnění se objevují přibližně u 10–15 % onkologických pacientů (Bajčiová, 2015).

2 Karcinom prsu

Podle údajů z roku 2017 tvoří karcinom prsu 15,7 % z celkového počtu nově diagnostikovaných zhoubných nádorových onemocnění u žen. Karcinom prsu je po zhoubných nádorech kůže druhou nejčtenější malignitou u žen (Zdravotnická ročenka České republiky, 2018). Nádorové onemocnění prsu se řadí mezi hormonálně závislé karcinomy. Pro jejich vznik a vývoj jsou velice významné estrogény, což jsou ženské pohlavní hormony. Estrogény vyvolávají v organismu expresi růstových faktorů a onkogenů, poté jejich produkty stimulují buňku k proliferaci. Při trvale zvýšené aktivitě estrogenu dojde k porušení rovnováhy proliferační a antiproliferační fyziologické aktivity působků a jejímu posunutí na stranu proliferace. Při tomto ději působí i další kancerogeny, které způsobují změny v genetické informaci buňky a dochází ke vzniku různých genetických abnormalit, může docházet i ke vzniku spontánních mutací. Tyto zásahy do genetické informace zvládne v některých situacích buňka opravit, pokud k této opravě nedojde a abnormalita zde zůstane, dojde k aktivaci onkogenů (myc, ras, HER-2/neu) nebo inaktivaci či alteraci antionkogenů (p53, Rb). Podle změny v genotypu dochází k přeměně fenotypu buňky, která se mění v dysplastickou až nádorovou. Ve stromatu probíhají změny, které podporují tento proces. Ve stimulovaných stromálních buňkách dochází k tvorbě proteolytických enzymů a angiogenních faktorů, které jsou důležité pro růst a šíření karcinomu (Prausová, 2010).

Ještě před vznikem karcinomu prsu se u pacienta může objevit prekanceróza, což je stav, při kterém se projevují změny předcházející malignímu nádoru, tzv. hyperplazie. Nejdříve z hyperplazií vyrůstají karcinomy *in situ*, což jsou neinvazivní karcinomy. Karcinomy *in situ* se mohou vyvíjet z epitelových buněk vývodů a lalůček, které byly zasaženy maligními změnami. Z epitelových buněk vývodů se vyvíjí duktální karcinom *in situ* (DCIS) a z epitelových buněk lalůček lobulární karcinom *in situ* (LCIS). Invazivní karcinomy jsou rozděleny na dvě skupiny – duktální a lobulární. Nejčastěji se vyskytují karcinomy duktální a to až u 84 % a v menší míře lobulární, které se objevují přibližně u 15 %. Dále se vyskytuje erysipeloidní karcinom, nazývaný také inflamatorní, který je nediferencovaný a řadí se k duktálním karcinomům. Tento typ karcinomu proniká do celého prsu, poté dochází k jeho zarudnutí, bolestivosti a postihuje i kůži, která vzhledem připomíná pomerančovou kůru. Inflamatorní karcinom se vyvíjí velmi rychle a také brzy vytváří metastázy v uzlinách podpaží, ale i v jiných orgánech (Prausová, 2010).

2.1 Příznaky karcinomu prsu

Příznaky u karcinomu prsu mohou být po dlouhou dobu přehlédnutelné a nevýrazné. Karcinom prsu může být objeven i přímo pacientkou při pravidelném samovyšetření prsu. Pacientka by se měla obrátit na odborného lékaře v případě změny tvaru a velikosti prsu, změn týkajících se bradavky – změna jejího tvaru či vtažení, ekzém, výtok z bradavky, ale i u změny povahy kůže prsu a jejího zbarvení, bolesti v oblasti prsu či podpaží. Celkové příznaky karcinomu jsou důsledkem výskytu vzdálených metastáz. Mezi tyto příznaky patří bolesti v kostech, nechutenství, hubnutí, teploty, ale i dušnost. Paraneoplastické kožní příznaky, jako je dermatomyozitida a *acanthosis nigricans* (kožní onemocnění projevující se jako ztlustělé a hyperpigmentované oblasti na kůži – Puri, 2011), mohou být typickým projevem tohoto onemocnění. Kromě fyzikálního vyšetření prsu a uzlin se vždy provádí i preventivní vyšetření pomocí ultrazvuku a rentgenu, ale také mamografie. Toto vyšetření se provádí z toho důvodu, že všechny počáteční nálezy nelze pouhým pohmatem odhalit (Prausová, 2010).

2.2 Rizikové faktory karcinomu prsu

Rizikové faktory, mající vliv na vznik nádoru prsu, jsou genetického, hormonálního, ale i nutričního původu. Rizikové faktory ovlivňující vznik sporadického nádoru prsu jsou tedy déle trvající expozice estrogenům (tomu je odpovídající brzké zahájení menstruace a opožděný nástup menopauzy), první gravidita ve vyšším věku, zkrácená doba laktace a dlouhodobá substituční léčba s užíváním exogenních estrogenů. Větší hrozbou je pro ženy, které nebyly gravidní. Vznik nádoru prsu může být ovlivněn i dalšími faktory, například užívání alkoholu, vysoký příjem tuků a také málo fyzické aktivity, což vede k nadváze. V menopauze je zvýšená koncentrace estrogenů v plazmě způsobena konverzí androgenních prekurzorů tvořených v nadledvinách za přítomnosti enzymů aromatáz zejména v tukové a další periferní tkáni. Mezi rizikové faktory patří i užívání estrogenních hormonů. Na vznik karcinomu prsu má vliv i působení zevního prostředí. Z hereditárních karcinomů prsu jsou nejčastější nádory způsobené mutacemi tumor-supresorových genů *BRCA1* a *BRCA2* (Prausová, 2010).

2.3 Diagnostika a vyšetření při podezření na karcinom prsu

Před samotným vyšetřením odborník vytvoří s pacientkou rodinnou i osobní anamnézu, která je velice důležitá a může pomoci odhalit, zda se jedná o dědičné onemocnění, ale i délku trvání nemoci a také její progresi. Poté pacientka absolvuje fyzikální vyšetření, které se provádí pohmatem prsů, které zahrnuje i vyšetření uzlin podpaží, nadklíčku a krku. Lékař ženu vyšetřuje při vzpřímeném hrudníku i v leže. Pokud nahmatá rezistenci, tak se dále zjišťuje její velikost, konzistence, ale také pohyblivost vůči spodní části a kůži. Zároveň také pohledem lékař určí viditelné změny v oblasti prsou (Prausová, 2010). Všechna následující vyšetření sloužící ke stanovení rozsahu karcinomu včetně anamnézy se nazývají stagingová (Chovanec a Náležinská, 2014). TNM klasifikace u daného nádoru se stanoví pomocí výsledků stagingu (Chovanec et al., 2008).

2.3.1 *Histologické vyšetření*

Histologické vyšetření se provádí při případném podezření na výskyt zhoubného nádoru v prsu (Chovanec et al., 2008). Odebrání vzorku tkáně a jeho následné histologické vyšetření jsou důležitými postupy pro určení diagnózy a neodkladně se provádí v případě podezření na zhoubný nádor v prsní tkáni. Vzorek získáme punkcí pomocí speciální tlustší jehly, která je obvykle zasazena do bioptického děla. Vzorek tkáně má tvar a tloušťku jehly a jeho délka bývá zpravidla do 2 cm. Z takového vzorku lze nyní udělat histologické vyšetření a další imunohistochemická vyšetření (Chovanec et al., 2008). V základní části histologického vyšetření se provede vyhodnocení velikosti nádoru. Poté následuje stanovení histologického typu nádoru a stupně jeho diferenciaci neboli grade, přičemž grade 1 je diferencovaný dobře, grade 2 středně a grade 3 nízc. Dále se provede posouzení, zda došlo k proniknutí nádorových buněk do lymfatických a krevních cév. Při proniknutí nádorových buněk do lymfatických či krevních cév dojde totiž k nepříznivému ovlivnění prognózy nádorového onemocnění. Nepříznivě na prognózu karcinomu působí také jeho perineurální šíření a výskyt nekróz v karcinomu (Prausová, 2010). Díky histologickému vyšetření dochází ke snížení počtu otevřených biopsií prsu u podezření na benigní nádor a zároveň lze brzy ověřit podezření na výskyt nádoru ještě před začátkem jeho onkologické léčby (Chovanec et al., 2008).

2.3.2 *Zobrazovací metody*

Významné postavení v diagnostice karcinomu prsu mají i zobrazovací metody, mezi které patří například mamografie a ultrasonografické vyšetření. Mamografická vyšetření se dělí na dva typy – klinické (diagnostické) a screeningové. Mamografie klinická slouží k vyhledání nádorů, které jsou těžko rozpoznatelné při fyzikálním vyšetření, ale také ke zobrazení hmatné rezistence a následnému určení jejich rozměrů a vztahu k sousedním strukturám. Zároveň je při tomto vyšetření možné odebrat tkáň pro histologické vyšetření. Mamografie dokáže zaznamenat mikrokalcifikace, které bývají prvním příznakem karcinomu prsu a z toho důvodu je vyhovující pro screeningové vyšetření karcinomu prsu (Chovanec et al., 2008). Mamografie screeningová se provádí preventivně u žen ve věku 45-69 let, vždy po dvou letech, aby došlo k zachycení případného karcinomu prsu ještě v bezpříznakovém stadiu. Nositelky mutace *BRCA1* a *BRCA2* genů by toto screeningové vyšetření od věku 30 let měly absolvovat každý rok (Chovanec et al., 2008). Jako doplňkové vyšetření k prohlédnutí prsu, uzlin v podpaží a nadklíčku se využívá ultrasonografické vyšetření. Toto vyšetření je významné pro mladé ženy ve věku 30-35 let s hmatnou rezistencí, u nichž výsledek mamografického vyšetření nemusí být příliš přehledný. Pod kontrolou ultrasonografu je možné odebrat tkáň pro histologické vyšetření (Prausová, 2010). Pro screening se tato metoda však příliš nehodí, jelikož dokáže bezpečně odlišit rezistenci až od rozměru 1 cm. Další zobrazovací metodou pro diagnostiku karcinomu prsu je pozitronová emisní tomografie (PET), která však není využívána u každé pacientky (Chovanec et al., 2008). PET dokáže rozlišit, zda je nález v prsu původu nenádorového nebo nádorového. Zobrazovací metody nacházejí uplatnění i při stanovení vzdálených metastáz, které mohly zasáhnout i další orgány (Prausová, 2010). Ke stanovení vzdálených metastáz v plicích se využívá rentgenový snímek, u jater a dutiny břišní je nejvhodnější metodou sonografické či CT vyšetření a u skeletu se provádí scintigrafie (screeningová metoda ke stanovení vzdálených metastáz v kostech – Engelhard et al., 2004) (Chovanec et al., 2008).

2.3.3 *Biochemické vyšetření*

Dalším vyšetřením, které je velice důležité v diagnostice karcinomu prsu, je vyšetření biochemické. Toto vyšetření se provádí u pacientek k posouzení jejich stavu před onkologickou léčbou a zahrnuje stanovení dvou nádorových markerů – CEA

a CA 15-3. Zvýšené hladiny markerů CEA a CA 15-3 se nejčastěji vyskytují u karcinomů prsů, které jsou rozšířeny do ostatních orgánů. Vyšetření markerů se provádí vícekrát v průběhu onkologické léčby pro kontrolu jejího vývoje a po skončení léčby, aby se zjistilo, zda nedochází k progresi neboli zhoršení nádorového onemocnění (Prausová, 2010).

2.3.4 Hematologické vyšetření

Informace o stavu krvetvorby získáme z výsledků hematologického vyšetření. Před provedením každého plánovaného chirurgického zákroku je vyžadováno také koagulační vyšetření (Prausová, 2010).

2.4 Léčba karcinomu prsu

Nejvhodnější léčebný postup je stanoven na základě zhodnocení výsledků všech vyšetření odbornými lékaři (Prausová, 2010). Skupina léčebných metod uplatňujících se při léčbě maligního karcinomu prsu zahrnuje chirurgické výkony, radioterapii, chemoterapii, ale také hormonální léčba. Do seznamu doporučených léčebných postupů u karcinomu prsu byla v poslední době začleněna i cílená biologická léčba (Chovanec et al., 2008). Tyto metody léčby se dále rozdělují na lokálně-regionální a celkové. Mezi lokálně-regionální se řadí chirurgická léčba a radioterapie a do skupiny celkových metod patří chemoterapie, hormonální a biologická léčba. Cílová léčba je stanovena na základě toho, o jaké stadium karcinomu se jedná. Jsou dva typy léčby-kurativní a paliativní. Účelem kurativní léčby je pacienta zcela vyléčit, kdežto cílem léčby paliativní je pouze omezení vývoje karcinomu a zároveň prodloužení a zkvalitnění pacientova života. Kurativní léčba zahrnuje především chirurgické zákroky, které bývají doplňovány dalšími léčebnými metodami a je vhodná se pro lokalizovaná nádorová onemocnění. Pro paliativní léčbu jsou důležité celkové neboli systémové léčebné metody (chemoterapie, hormonoterapie a biologická léčba), chirurgické zákroky se u tohoto typu léčby používají jen velmi málo. Paliativní léčba je využívána u pacientů s metastatickými karcinomy (Coufal a Fait, 2011).

2.4.1 Chirurgická terapie

Chirurgická terapie patří mezi lokálně-regionální léčebné metody (Chovanec et al., 2008) a zároveň je hlavní metodou při léčbě časného karcinomu (Chovanec a Náležinská, 2014). Základní chirurgická léčba je vhodná pro léčbu karcinomů do klinického stadia IIIA. Druhotně je tato léčba použita po předešlé léčbě hormony, cytostatiky či radioterapii u karcinomu s klinickými stadii IIIB a IV v případě, že je karcinom operovatelný (Chovanec et al., 2008). Ženám, u kterých je prokázána mutace *BRCA1* či *BRCA2* genu, je doporučena oboustranná mastektomie a ovariectomie neboli odstranění vaječníků (Prausová, 2010).

Paliativní chirurgické zákroky tzv. sanační mastektomie jsou indikovány, pokud se u pacientky objeví vysoké riziko vzniku krvácení karcinomu nebo při zvrhodování prsu (Chovanec et al., 2008).

Dříve byly chirurgické zákroky radikálnější než v současné době, při operaci byl pacientce odstraněn nejen prs, ale i hrudní sval a obsah axily, především lymfatické uzliny. Nyní je užívána modifikovaná radikální mastektomie dle Pateyho, jejíž součástí je i chirurgické vynětí všech axilárních lymfatických uzlin při zasažení dceřinými druhotnými ložisky karcinomu prsu. Nutným předpokladem u tohoto léčebného výkonu je vyjmout a následně histologicky vyšetřit minimálně 10 uzlin (Prausová, 2010). Axilární lymfadenektomie neboli vynětí všech axilárních lymfatických uzlin se již provádí v menší míře a je nahrazována odstraněním tzv. sentinelové uzliny. Nejdříve je sentinelová uzlina podrobena histologickému vyšetření a podle výsledků je možné určit stav ostatních lymfatických uzlin v určité oblasti. Sentinelová uzlina je totiž první uzlinou, která odvodňuje konkrétní oblast lymfatického systému, z toho důvodu je očekáváno, že se nádorové buňky nejprve objeví v této uzlině. Po provedení histologického vyšetření sentinelové uzliny lze určit, zda jsou postiženy ostatní lymfatické uzliny v příslušné oblasti či nikoli (Chovanec et al., 2008).

Využití radikálních mastektomií je v poslední době omezováno pouze na případy, u kterých je kontraindikována šetrnější metoda chirurgické léčby nazývaná prs šetřící operace. Tato metoda je v současné době velmi využívána, protože při ní dochází k odstranění pouze prsní tkáně napadené nádorovými ložisky. Prs šetřící operace slouží tedy hlavně k histologickému ověření karcinomu a jeho následnému šetrnějšímu odstranění (Chovanec et al., 2008). Do skupiny prs šetřících operací řadíme kvadrantektomii a lumpektomii. Při kvadrantektomii je odebrán pouze daný kvadrant

s karcinomem. Lumpektomie zahrnuje odebrání ložiska nádoru s dostatečným lemem nepoškozené tkáně (Prausová, 2010).

2.4.2 Radioterapie

Radioterapie patří stejně jako chirurgická léčba mezi lokálně-regionální léčebné způsoby. Radioterapie se dělí na dva druhy – externí radioterapie a brachyradioterapie (Chovanec et al., 2008). Externí radioterapie také nazývaná teleterapie se používá k ozařování z větší vzdálenosti od pacienta, takže dochází k vnějšímu ozařování nádoru (Prausová, 2010). U brachyradioterapie je zdroj záření operativně vložen rovnou do nádorového ložiska (Chovanec et al., 2008). Při brachyterapii je tedy nádor ozařován na krátkou vzdálenost (Prausová, 2010). U externí radioterapie se jako zdroj záření se využívá lineární urychlovač (Prausová, 2010), který vydává záření o vysoké energii (Chovanec et al., 2008). Velice spolehlivý plánovací systém poskytuje zobrazení ozařované tkáně ve 3D (Prausová, 2010). Nejvíce se uplatňuje adjuvantní radioterapie (Prausová, 2010), která je používána po prs šetřících chirurgických zákrocích k ozáření zbylé žlázy, axilární oblasti, ale také jizvy po odstranění prsu. Radioterapie neoadjuvantní je v současnosti velmi málo používanou metodou. Radioterapie je důležitá i při symptomatickém paliativním léčení dceřiných druhotných ložisek karcinomu. Pomocí této metody je možné zamezit lokálně-regionálnímu návratu nádorového onemocnění (Chovanec et al., 2008).

2.4.3 Chemoterapie

Chemoterapie patří mezi léčebné metody systémové. Při léčbě karcinomu prsu tyto metody převládají nad ostatními (Prausová, 2010). Ve většině případů se aplikuje chemoterapeutická léčba jako kombinace více typů cytostatických léčiv, což vede ke zvýšení účinku této léčebné metody. Nejvíce využívanou kombinaci cytostatik tvoří cyklofosfamid, doxorubicin a fluorouracil. Chemoterapie se v současné době kombinuje i s jinými léčebnými postupy. Nejvhodnější léčebnou metodou v případě generalizovaného karcinomu prsu je kombinace chemoterapie a hormonoterapie. Hodnoty účinnosti této kombinované léčby se nachází mezi 50 až 80 %. Chemoterapeutická léčba se dělí na tři kategorie – chemoterapie adjuvantní, neoadjuvantní a paliativní (Chovanec et al., 2008).

2.4.3.1 *Adjuvantní chemoterapie*

Adjuvantní léčba se využívá k doléčení zbylého onemocnění po provedeném chirurgickém zákroku (Prausová, 2010). Účelem adjuvantní chemoterapie je zničit mikrometastázy, což jsou zbylé nádorové buňky dosahující velmi malých rozměrů a jsou těžko rozpoznatelné. Nasazení léčby je ideální v maximálním časovém odstupu tří týdnů od vykonání operace. Při této léčbě je podstatné dodržet stálou intenzitu dávky cytostatik (Chovanec et al., 2008). Tento typ chemoterapie bývá stanoven u pacientek, jejichž prognostické faktory nejsou příznivé (Prausová, 2010).

2.4.3.2 *Neoadjuvantní chemoterapie*

U neoadjuvantního typu chemoterapeutické léčby se cytostatika aplikují ještě před provedením chirurgického zákroku (Chovanec et al., 2008). Neoadjuvantní chemoterapie je využívána pro léčbu místně pokročilých karcinomů prsů, jejíž účelem je zmenšení karcinomu, umožnění prs zachovné operace a zlepšení operovatelnosti karcinomu (Prausová, 2010).

2.4.3.3 *Paliativní chemoterapie*

Paliativní chemoterapie je stanovena u pacientek s karcinomem rozšířeným do ostatních orgánů, u nichž slouží nejen k udržení kvality života pacientek (Prausová, 2010), ale i k jeho prodloužení (Chovanec et al., 2008). Tato léčebná metoda je velice významná pro pacientky s karcinomem prsu v klinickém stadiu IV (Chovanec et al., 2008).

2.5 **Rekonstrukce prsu po mastektomii**

Operativní rekonstrukce prsu může být okamžitá, odložená nebo odloženě-okamžitá. Pokud je zvolena metoda okamžité rekonstrukce prsu, tak je plastický zákrok prsu prováděn přímo při mastektomii (Dražan a Měšťák, 2006). Při této operaci je nutná přítomnost a spolupráce, jak chirurgického, tak plastického lékaře (Coufal a Fait, 2011). Při okamžité rekonstrukci prsu nesmí být vyžadována pooperační aplikace chemoterapie ani radioterapie na zrekonstruovaný prs, protože by došlo k jeho deformaci nebo k posunu či odhalení implantátu (Dražan a Měšťák, 2006). Pokud se u ženy po modifikované radikální mastektomii neobjevují známky nemoci a byla u ní ukončena onkologická léčba,

může po dvou až pěti letech absolvovat odloženou rekonstrukci prsu (Prausová, 2010). Rekonstrukce bývá odložená z důvodu pooperační aplikace chemoterapie či radioterapie, při nejasném průběhu nádorového onemocnění nebo pokud onkochirurg či pacientka odmítne provedení rekonstrukce prsu z důvodu časové náročnosti operace. Poslední technikou je odloženě-okamžitá rekonstrukce prsu, která je provedena do jednoho měsíce od mastektomického zákroku. Tato doba je potřebná pro určení diagnózy, stupně diferencovanosti nádoru a léčebného postupu. Pokud onkologický léčebný postup nezahrnuje radioterapii ani chemoterapii, pak je možné provést rekonstrukci prsu. Zároveň nemusí být provedena žádná rekonstrukční operace prsu, záleží pouze na rozhodnutí pacientky (Dražan a Měšťák, 2006). K plastické rekonstrukci je použita buď vlastní tkáň pacientky odebraná ze stěny břišní či ze zad nebo umělý implantát (Prausová, 2010).

3 Genetické poradenství a diagnostika

3.1 Rodinná anamnéza

Z rodinné anamnézy lze přesně stanovit míru rizika, která slouží k určení jedinců se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu, u nichž lze včas sledovat průběh nádorového onemocnění a zavést určitá preventivní opatření. Mutační analýza může být u pacienta stanovena při rodinné anamnéze s vysokou pravděpodobností výskytu predispozice ke vzniku nádorového onemocnění podmíněného určitým genem. Pokud je u pacienta detekována germinální mutace v genu s predispozicí ke karcinomu, pak je možné otestovat i další příbuzné a zjistit, zda je u nich mutace genu také přítomna či nikoli. Díky mutační analýze lze odhalit členy rodiny, kteří jsou nositeli mutace v predispozičním genu, mají tudíž výrazně zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění (Turnbull a Hodgson, 2005).

3.2 Genetické vyšetření

Při případném podezření lékaře na výskyt hereditárního karcinomu prsu je pacientce nejdříve doporučena genetická konzultace. Při konzultaci genetik s pacientkou vytvoří osobní i rodinnou anamnézu v rozsahu 4 generací. Dále se ověřuje, zda jsou získané informace o rodinné anamnéze pravdivé. Prověření rodinné anamnézy je provedeno pomocí onkologických registrů, lékařských zpráv a úmrtních listů. Pokud je potvrzena dědičná forma nádorového onemocnění a jsou dodržena všechna stanovená kritéria, tak může být pacientce doporučeno genetické testování, ke kterému je nezbytně nutné její písemné svolení (Foretová, 2008). Nyní se při testování hereditárních nádorových onemocnění vyšetřují hlavně vysoce penetrantní geny, které jsou spojeny s rizikem vzniku karcinomu (Foretová et al., 2014).

Mutace znamená odchýlení se od kontrolní sekvence DNA. K molekulárně genetickému vyšetření se velice často využívá právě DNA, která se izoluje z buněk periferní krve, lze použít i mRNA, u které je ale nutný přepis do komplementární DNA. Při použití mRNA musíme počítat s možností, že dojde k její rychlé degradaci. Mutace jsou detekovány za pomoci metod založených na PCR, která slouží k amplifikaci vybraných úseků DNA. Úseky DNA s možným výskytem mutací jsou detekovány screeningovými metodami, které k jejich detekci využívají rozdílné konformace

a elektroforetické pohyblivosti u mutované a zdravé DNA. V současnosti se k vyšetřování velkých genových přestaveb využívá metoda MLPA. Velké genové přestavby zahrnují například chybění či duplikace exonů, ale i chybění celého genu (Foretová, 2008). Pomocí sekvenování lze stanovit pořadí všech nukleotidů (Foretová et al., 2014), poté je možné přesně stanovit typ mutace (Foretová, 2008). Genetické vyšetření v některých případech zahrnuje i prediktivní genetický test, který se provádí u příbuzných a zaměřuje se na vyšetření přítomnosti stejné mutace jako u pacientky (Foretová, 2008).

BRCA1 i *BRCA2* jsou obrovské geny, z toho důvodu bylo dříve jejich vyšetření složité a trvalo dlouho (Foretová, 2008). V dnešní době je vyšetření těchto genů velice jednoduché, především díky metodě NGS, která umožňuje osekvenovat celý gen najednou za velice krátkou dobu (Puchmajerová et al., 2018). K vyšetření zárodečných mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* je využívána genomická DNA. Při genetickém vyšetření *BRCA* genů by měla být provedena i kompletní mutační analýza exonů a exon-intronových spojení u *BRCA1* a *BRCA2* genů, která se provádí přímým sekvenováním nebo některou z dalších vysoce senzitivních analytických metod. U genu *BRCA1* je vyšetřeno 24 exonů a u *BRCA2* 27 exonů (Šubrt et al., 2015). K tomuto testování se u genu *BRCA1* velmi často přidává výše zmíněná metoda MLPA sloužící k odhalení velkých genových přestaveb. V posledních letech se využívá i technologie NGS neboli masivně paralelní sekvenace. NGS se využívá pro cílenou resekvenaci velkých genů. Výhody NGS oproti Sangerovu sekvenování jsou kratší čekací doba na výsledky a také snížení výdajů na provedení jednoho vyšetření (Šubrt et al., 2015). V případě pozitivního výsledku genetického testování je nádorové onemocnění dědičné, ale u negativního výsledku nelze dědičný původ potvrdit ani vyloučit (Foretová et al., 2014).

Po genetickém testování je nutné podstoupit další genetickou konzultaci bez ohledu na charakter výsledku testování. Konzultace zahrnuje rozhovor, při kterém jsou podrobně probrány informace ohledně závažnosti výsledku testování pro pacientku a její rodinu. Dalším účelem konzultace je zhodnocení vlivu výsledku na psychiku pacientky a nabídnutí další pomoci. V případě odmítnutí genetického vyšetření ze strany pacientky je důležité pacientku preventivně sledovat a případně jí zajistit preventivní operaci nebo léčbu, protože u ní přetrvává riziko vzniku nádorového onemocnění (Šubrt et al., 2015).

Genetické testování nemusí být pro každého pacienta přínosné. U některých jedinců působí testování naopak nepříznivě, nejčastěji toto působení zasahuje jejich sociální

a psychickou pohodu (Struewing et al., 1995). Podle výsledků výzkumu provedeného Struewingem et al. (1995) má pozitivní výsledek genetického testování nežádoucí vliv na manželství, náladu či psychický stav pacienta, což se projevuje úzkostmi a depresemi.

4 Geny s dědičnou predispozicí pro vznik nádorového onemocnění prsu

Vysoké riziko pro vznik nádorového onemocnění prsu mají nositelky mutace některého z genů s predispozicí k rozvoji dědičného karcinomu prsu. Také se u nositelek mutace v predispozičním genu objevuje karcinom mnohem dříve než u sporadické formy onemocnění, zasažení prsu u nich bývá oboustranné, a zároveň je u nich zvýšené riziko vzniku karcinomů s jinou lokalizací. Mezi geny s predispozicí pro vznik karcinomu prsu patří *BRCA1* a *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *LKB1/STK11*, *ATM*, *CHEK2*, *NBS1*, *PALB2*, *TGFβ1*, *CASP-8* a spousta dalších (Pohlreich et al., 2012).

4.1 Geny s nízkou penetrancí

Do skupiny genů s nízkou penetrancí jsou řazeny geny jako *FGFR2*, *TNRC9*, *MAP3K1*, *LSP1*, *TGFβ1* a *CASP-8* (Pohlreich et al., 2012).

4.2 Geny se střední penetrancí

Mezi geny se střední penetrancí patří geny *ATM*, *BRIP1*, *PALB2*, *NBS1* a *CHEK2* (Pohlreich et al., 2012).

4.3 Geny s vysokou penetrancí

Geny s vysokou penetrancí jsou *BRCA1* a *BRCA2*, *TP53*, *PTEN* a *LKB1* (Pohlreich et al., 2012). Nejvýznamnější geny s vysokou penetrancí, které predisponují ke vzniku karcinomu prsu jsou *BRCA1* a *BRCA2*. Velice významným vysoce penetrantním genem je i *TP53*, který souvisí s Li-Fraumeniho syndromem (Roberts et al., 1999) a zahrnuje mimo jiné i zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu s velmi brzkým nástupem. Zárodečné mutace genu *PTEN* způsobují onemocnění nazývané Cowdenův syndrom. U tohoto syndromu je také výrazně zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění prsu (Easton, 1999).

5 *BRCA* geny

Tyto geny kódují multifunkční proteiny a jsou řazeny do skupiny tumor-supresorových genů a pokud dojde vznikem mutací na obou alelách příslušného genu k vyřazení z jeho funkce, způsobí to nesprávné fungování regulace buněčného cyklu a může docházet k nekontrolovanému dělení buněk až ke vzniku nádorového onemocnění. Také jsou významné pro udržení integrity a stability genomu. Proteiny BRCA1 a BRCA2 jsou součástí reparačních procesů vyvolaných poškozením DNA (Sedláková, 2018).

5.1 Charakteristika genu *BRCA1*

Gen *BRCA1* (OMIM 113705) byl identifikován v roce 1994 za pomoci metod pozičního klonování (Nagy et al., 2004). Je lokalizován na chromozomu 17 (17q21) a je složen celkem z 24 exonů (Cibula a Petruželka, 2009), ale jen 22 z nich je kódujících a jsou rozloženy na 100 kb genomické DNA. Jeho produktem je protein, který je tvořen z 1 863 aminokyselin (Hatina a Sykes, 1999). Největší exon genu *BRCA1* je exon 11, ostatní exony jsou poměrně malé (Cibula a Petruželka, 2009). Tento gen obsahuje dva alternativní promotory nacházející se před exony nazývanými 1a a 1b, které zahrnují shluky CpG motivů, jež se opakují. Exony 1a a 1b obsahují vazebné sekvence pro interakci s transkripčními faktory. Začátek transkripce neboli přepisu probíhá na 1a či 1b exonu. Jejich transkripty se mohou nacházet v různých tkáních, kde mají různé zastoupení. První exony, 1 a 2, jsou od sebe odlišné velikostí i sekvencí, ale i přesto vždy vzniká protein o normální velikosti, protože iniciační kodon je umístěn až na exonu 2. U transkriptů, které obsahují exon 1a, dochází k největší expresi ve tkáni mléčné žlázy a jen transkript zahrnující exon 1b se exprimují v placentární tkáni (Cibula a Petruželka, 2009).

5.2 Protein BRCA1

Protein BRCA1 obsahuje 1 863 aminokyselin (Hatina a Sykes, 1999), má molekulovou hmotnost 220 kDa (Rosen et al., 2003) a je překládán ze 7,8 kb dlouhé majoritní mRNA, kterou kóduje gen *BRCA1* (Hatina a Sykes, 1999). BRCA1 protein se vyskytuje v buněčném jádře a maximální exprese probíhá v G2 a S fázi buněčného cyklu (Cibula a Petruželka, 2009). K významné expresi BRCA1 proteinu dochází v brzlíku

a varlatech, na nižší úrovni je tento protein exprimován v epiteliální tkáni mléčné žlázy (Hatina a Sykes, 1999). BRCA1 protein se skládá z N-terminální oblasti s RING doménou, centrální oblasti a C-terminální oblasti se dvěma BRCT doménami (Clark et al., 2012).

5.2.1 RING doména

V N-terminální části je umístěna doména zvaná RING (Nagy et al., 2004), která je tvořena „RING finger“ doménou, α helixy a β skládanými listy (Clark et al., 2012). „RING finger“ doména má motiv zinečnatého prstu (Hatina a Sykes, 1999). RING doména je složena ze sedmi konzervovaných zbytků cysteinu a jednoho histidinu, které zprostředkovávají vazbu se dvěma zinečnatými kationty, které stabilizují tuto strukturu. „RING finger“ je tedy kulovitá struktura, jejíž jádro se skládá ze tří vláken β skládaného listu, centrální spirály α helix a ohraničujících spirál α helix, které se k „RING finger“ staví kolmo. Proteinová doména „RING finger“ je součástí řady dalších proteinů (Clark et al., 2012). V oblasti „RING finger“ u *BRCA1* genu byly nalezeny mutace s nádorovou predispozicí (Meza et al., 1999). Dochází k vzájemnému působení mezi doménou RING a DNA. Monomery BRCA1 proteinu nejsou moc stabilní, tvoří tedy spíše homodimery, ale ještě častěji se spojují s proteinem BARD1 ve velmi stabilní heterodimery (Meza et al., 1999). K tomuto spojení dochází v N-terminálních oblastech proteinů přes jejich „RING finger“ domény. Tyto domény na BRCA1 i BARD1 proteinu jsou nezbytně nutné k vytvoření jejich heterokomplexu (Hashizume et al., 2001). „RING finger“ doména heterokomplexu těchto proteinů se vyznačuje podstatnou ubikvitin ligázovou aktivitou, která může být narušena mutací RING domény v proteinu BRCA1. „RING finger“ domény homodimerů BRCA1 a BARD1 vykazují o dost nižší ubikvitin ligázovou aktivitu. Ubikvitin ligázová aktivita je důležitá při ubikvitinci, kdy dochází ke tvorbě polyubikvitinových řetězců na substrátových proteinech a tento děj je katalyzován právě ubikvitin ligázou neboli E3. Tyto ubikvitinové substráty jsou proteazomem okamžitě degradovány (Hashizume et al., 2001). V tomto procesu mají velký význam dva enzymy – E1, což je enzym aktivační a E2 neboli enzym konjugační. K aktivaci ubikvitinu dochází díky enzymu E1 za spotřeby ATP. Zároveň dojde k ligaci karboxylové skupiny nacházející se v C-terminální oblasti ubikvitinu na aktivní cysteinový zbytek, který je umístěn na enzymu E1. Poté následuje přenos ubikvitinu na další aktivní cysteinový zbytek, který je umístěn na enzymu E2. Nakonec je ubikvitin

přenesen až na substrátový protein, který má být degradován. Tento protein je rozpoznán pomocí E3 ubikvitin ligázy. Enzymy E1 a E2 jsou tedy důležité pro transport ubikvitinu na substrátový protein určený k degradaci (Li a Ye, 2008). Tento proces má jednu velice důležitou funkci – slouží k „označení“ proteinu, který má být degradován v proteazomu (Lorick, 1999).

5.2.2 Centrální oblast

Centrální oblast BRCA1 proteinu je obklopen RING a BRCT doménami, nachází se tedy uprostřed proteinu (Mark et al., 2005) a je kódována exony 11–13 (Masuda et al., 2016). Tato oblast obsahuje přibližně 1 500 aminokyselin (Mark et al., 2005), které nejsou nijak uspořádané. Jejich neuspořádanost je důvodem strukturální flexibility centrální oblasti BRCA1 proteinu. Strukturální flexibilita této oblasti je důležitá pro spoustu interakcí. Většina z těchto interakcí se účastní opravy DNA, jsou to například interakce s proteiny p53, RAD50, FANCA, ale i RAD51 (Naseem et al., 2006). Největší část BRCA1 proteinu je kódována právě touto centrální oblastí, ale její funkce není stále ještě objasněna (Masuda et al., 2016). Exon 11 je velice významný, protože kóduje nejvíce proteinu, je to více než 60 %. Dále jsou na exonu 11 umístěny dva jaderné lokalizační signály (NLS) a také zde dochází k interakci mezi ním a některými proteiny, konkrétně mezi RAD51, p53, Rb a c-myc (Nagy et al., 2004). Vazba BRCA1 proteinu a DNA probíhá v oblasti, kterou kóduje právě exon 11 (Masuda et al., 2016).

5.2.3 BRCT domény

V C-terminální oblasti se nachází transkripčně aktivační doména a také zde dochází k vzájemnému působení s RNA polymerázou II i dalšími proteiny (Nagy et al., 2004). Tato doména zahrnuje dvě tandemová opakování BRCT (Yu et al., 1998). BRCT domény se rozkládají na sekvenci aminokyselin 1650–1863. Jedno opakování BRCT domény je tvořeno třemi α helixy, které obalují β skládaný list složený ze čtyř vláken. Tyto tři α helixy jsou poskytovány BRCT doménami – α helix 2 je z BRCT1 a α helix 1 a 3 se nacházejí na BRCT2. Poté se dvě opakování BRCT sbalují dohromady a spojuje je linkerová šroubovice. Struktura čtyřvláknového β skládaného listu obalená třemi α helixy tvoří hydrofobní jádro (Clark et al., 2012).

Hlavní funkcí BRCT domén je zprostředkování fosfoproteinové interakce probíhající mezi proteinem BRCA1 a proteiny, které jsou fosforylovány prostřednictvím ATM a ATR, což jsou kinázy k jejichž aktivaci dochází při poškození DNA. BRCT domény řadíme do dvou skupin podle toho, jaké rozeznávají fosfoproteiny. Máme domény BRCT třídy I a třídy II. BRCT zařazené do třídy I rozeznávají zbytky fosfoserinu (pSer) a třídy II rozeznávají kromě zbytků fosfoserinu (pSer), také zbytky fosfothreoninu (pThr) (Clark et al., 2012). BRCT domény jsou pro gen BRCA1 velice důležité, díky nim je schopný regulovat transkripci RNA (Yu et al., 1998). Domény BRCT se objevují i u spousty dalších proteinů, které se účastní opravy DNA a také regulace buněčného cyklu (Venkitaraman, 2001).

5.3 Charakteristika genu *BRCA2*

K objevení genu *BRCA2* (OMIM 600185) došlo v roce 1994 (Cibula a Petruželka, 2009) a klonován byl v roce 1995 (Davies et al., 2001). *BRCA2* leží na chromozomu 13 (13q12–13). Obsahuje 27 exonů, které jsou rozloženy do oblasti asi 70 kb genomické DNA (Hatina a Sykes, 1999). Z 27 exonů je kódujících pouze 25 (Cibula a Petruželka, 2009). Největšími exony na *BRCA2* jsou 10 a 11 a právě tyto dva exony zahrnují 59 % celé kódující sekvence. Další exony tohoto genu jsou poměrně krátké (Cibula a Petruželka, 2009). Protein produkovaný tímto genem obsahuje 3 418 aminokyselin (Hatina a Sykes, 1999).

5.4 Protein *BRCA2*

Genem *BRCA2* je kódována 11–12 kb dlouhá mRNA, díky níž vzniká tento protein, který je složen ze 3 418 aminokyselin. Tento protein má molekulovou hmotnost 390 kDa. Ve středu proteinu *BRCA2* se nachází osm opakujících se sekvencí, které se nazývají BRC opakování a jsou kódovány exonem 11. BRC opakování mají vysoce konzervovanou strukturu (Davies et al., 2001). C-terminální oblast obsahuje jaderný lokalizační signál (NLS), který má tandemové uspořádání. Protein *BRCA2* se nachází v jádře buňky a k jeho expresi dochází v G2 a S fázi buněčného cyklu (Cibula a Petruželka, 2009).

Protein *BRCA2* se společně s proteinem *BRCA1* podílí na opravě DNA. Díky tomuto proteinu dochází také k řízení aktivity RAD-51 a ta se uplatňuje při homologních

rekombinacích (Nagy et al., 2004). Šest BRC opakování se účastní interakce mezi proteiny BRCA2 a RAD51, konkrétně se jedná o opakování BRC1–BRC4, BRC7 a BRC8. Po vazbě proteinu RAD51 s DNA dojde k tvorbě nukleoproteinových vláken, v nichž je DNA obklopena a uzavřena do proteinového obalu. Při interakci mezi RAD51 a BRC3 nebo BRC4 na BRCA2 proteinu dochází k zablokování tvorby tohoto nukleoproteinového vlákna. Změny v BRC3 jsou sice podobné mutacím v BRCA2, které jsou úzce spjaty s rakovinou, ale nemají tento účinek. V buňkách obsahujících zkrácení řetězce proteinu BRCA2 spojené s karcinomem je chybný transport RAD51 do jádra. BRCA2 protein je schopen regulovat umístění uvnitř buňky, ale i schopnost proteinu RAD51 vázat DNA (Davies et al., 2001). Po vyřazení genu *BRCA2* z funkce dojde ke ztrátě kontroly a regulace jeho proteinu a následkem toho může dojít ke genomické nestabilitě, ale také k onkogenezi. (Davies et al., 2001).

5.5 Společná funkce proteinů BRCA1 a BRCA2

Geny *BRCA1* a *BRCA2* kódují tyto jaderné fosfoproteiny, které jsou součástí multiproteinových komplexů a ty se podílejí na opravách dvouřetězcových zlomů DNA, zejména mechanismem homologní rekombinace, ale zároveň se účastní regulace buněčného cyklu a transkripce (Kolářová, 2017).

6 Mutace v *BRCA* genech

Zatím bylo objeveno více mutací u *BRCA1* genu než u *BRCA2*. Nejvíce se vyskytují frameshift mutace, což jsou mutace posunové, které vznikají inzercí či delecí jednoho nebo dvou nukleotidů a v důsledku toho pak dochází k posunu čtecího rámce. Další častou mutací je nonsense, což je bodová mutace, při které dochází k nahrazení nukleotidu v kodónu a tato změna vede ke vzniku stop kodónu, což zapříčiní předčasný konec překladu bílkoviny. Frameshift a nonsense mutace jsou důvodem zkrácení bílkoviny a ztráty její funkce. V menší míře než výše zmíněné mutace, se také objevuje mutace missense, ke které dochází nahrazením nukleotidu v kodónu a tím k zařazení chybné aminokyseliny při tvorbě bílkoviny. Tyto mutace tvoří méně než 10 % všech mutací *BRCA* genů (Nagy et al., 2004).

V důsledku mutací *BRCA1* a *BRCA2* genů dochází k výraznému zvýšení celoživotního rizika vzniku karcinomu prsu a ovarií, ale zároveň i k vzrůstu rizika dalších zhoubných onemocnění. Jedná se zejména o karcinomy kolorekta, endometria, tenkého střeva, žaludku, prostaty, slinivky, žlučových cest a melanomu (Kolářová, 2017). U mutací *BRCA1* genu jsou to především nádory tlustého střeva a nádory prostaty u mužů a u mutací genu *BRCA2* to bývají nádory pankreatu a melanomy (Prausová, 2010).

7 Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce bylo:

1. Seznámit se s nejčastějšími hereditárními karcinomy, jejich predispozičními geny a metodami pro analýzu mutací.
2. Připravit 20 vzorků a následně je vyšetřit sekvenační metodou a seznámit se s další možnou technikou pro genetické vyšetření vzorků, a to s metodou MLPA.
3. Provést analýzu a srovnání dat získaných sekvenací s údaji z genetické databáze NCBI, popřípadě klasifikaci nalezených mutací.

8 Metodika

Praktickou část mé bakalářské práce jsem vykonala v laboratoři Zdravotně sociální fakulty Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích a sekvenování vybraných úseků *BRCA* genů jsem nechala provést formou služby u firmy Genseq s.r.o. Analyzovala jsem 20 anonymizovaných vzorků od náhodně vybraných jedinců převážně z Jihočeského kraje. U vyšetřovaných jedinců tedy nebylo přímo indikováno genetické vyšetření genů *BRCA1* a *BRCA2*. U této skupiny jedinců jsem provedla odběr vzorků s následnou izolací DNA. Z vyizolovaných vzorků jsem pomocí metody PCR naamplifkovala vybraný úsek genu, zkontrolovala jeho přítomnost prostřednictvím elektroforézy, přečistila tento PCR produkt a poté odeslala k sekvenaci. S vyšetřovací metodou MLPA jsem měla být blíže seznámena na pracovišti Pronatal v Praze, což mi nebylo umožněno vzhledem k aktuální situaci ohledně koronaviru COVID-19. Základy vyšetření pomocí metody MLPA jsem nastudovala z odborné literatury a pracovních protokolů od firmy MRC Holland.

8.1 Odběr vzorků

V praktické části jsem nejdříve odebrala vzorky DNA. Vzorky jsem získala pomocí bukálního stěru, a poté z nich provedla izolaci DNA. Pacienty jsem řádně poučila, že by minimálně hodinu před provedením bukálního stěru neměli nic jíst ani pít, pouze čistou vodu. Bukální stěr jsem prováděla sterilním výtěrovým tamponem, kterým jsem po dobu jedné minuty stírala bukální sliznici dutiny ústní a tamponem jsem zároveň otáčela pro využití celé jeho plochy. Výtěrový tampón jsem poté vložila do zkumavky a řádně označila.

8.2 Izolace DNA

K izolaci jsem využila komerčně dodávaný kit založený na speciálních mikrokolonkách od firmy Generi Biotech (kit for isolation of DNA). Při izolaci jsem postupovala podle pracovního návodu od výrobce Generi Biotech.

Pracovní postup:

Ještě před provedením samotné izolace jsem zapnula vodní lázeň a vyhřála eluční pufr BL4 na 70 °C a nechala jsem rozpustit proteinázu K.

Dále jsem nadepsala štítky a 1,5 ml mikrozkušavky označila čísla ze štítků. Do těchto mikrozkušavek jsem sterilně odstříhla výtěrové tampóny, přidala 200 μ l PBS, 200 μ l BL1 a 25 μ l proteinázy K, poté jsem řádně zvortexovala.

Vzorky jsem nechala inkubovat 15 minut při teplotě 70°C. Během inkubace jsem si pro každý vzorek připravila jednu kolonku a dvě sběrné zkušavky. Kolonky jsem si popsala odpovídajícími čísly daných vzorků, vložila do sběrných zkušavek a nalepila si štítky na 1,5 ml mikrozkušavky pro konečnou DNA. Po inkubaci jsem vzorky zvortexovala a krátce stočila. Poté jsem přidala 210 μ l 96% ethanolu a opět zvortexovala a stočila.

Sterilně jsem odstranila výtěrové tampóny a lyzát z každé mikrozkušavky jsem přepipetovala na předem připravené a označené kolonky a provedla centrifugaci po dobu 1 minuty při 11000 x g.

Poté jsem kolonky opatrně přemístila do nových sběrných zkušavek a filtrát i se zkušavkou vyhodila. Následně jsem přidala 500 μ l pufru BL2 a nechala stočit 1 minutu při 11000 x g. Filtrát ze sběrných zkušavek jsem vylila a přidala jsem 600 μ l promývacího pufru BL3 a nechala centrifugovat po dobu 2 minut při 11000 x g. Opět jsem vylila filtrát ze sběrných zkušavek a provedla centrifugaci po dobu 30 sekund při 11000 x g. DNA zůstala navázaná na silikagel v kolonce, proto jsem sběrnou zkušavku s filtrátem vyhodila.

Kolonku s DNA jsem opatrně přendala do připravené a označené 1,5 ml zkušavky pro konečnou DNA. Přidala jsem 20 μ l předeřátého pufru BL4 a nechala jsem inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby jsem vzorky stočila 1 minutu při 11000 x g. Roztoky DNA jsem přepipetovala na kolonku, nechala 5 minut inkubovat a znovu centrifugovala po dobu 1 minuty při 11000 x g. Kolonku jsem vyhodila a získala jsem čistou DNA v řádně označené 1,5 ml mikrozkušavce. Vyizolovanou DNA jsem skladovala při teplotě -20 °C.

8.3 Měření koncentrace vzorků DNA

Pro měření koncentrace DNA jsem používala přístroj Colibri Microvolume Spectrometer. Pomocí mikropipety jsem odebrala 1 μ l vzorku DNA a umístila ho do přístroje. Koncentraci vzorků jsem měřila proti pufru BL4. Naměřené koncentrace vzorků se pohybovaly v rozmezí 20-150 ng/ μ l.

8.4 PCR

PCR metoda slouží k amplifikaci neboli vytvoření dostatečného množství kopií vybraného úseku DNA pro další analýzu. Do každé PCR reakce je nutné dát DNA, dva primery (F – forward a R – reverse), které nám ohraničí vybraný úsek DNA, nukleotidy, které slouží jako základní stavební kameny a DNA polymerázu, což je klíčový enzym pro syntézu PCR produktu. PCR reakce probíhá v přístroji zvaném tepelný cyklovač neboli termocykler, který obsahuje tepelný blok s otvory, do kterých se vkládají mikrozkušavky s reakční PCR směsí. Termocykler zvyšuje a snižuje teplotu tohoto bloku. Nejdříve dochází k zahřátí reakčního roztoku, což vede k denaturaci, tedy rozdělení dvoušroubovice DNA na dvě vlákna. Následně se teplota sníží a dojde k nasednutí primerů na vybrané úseky DNA. Dále dochází opět ke zvýšení teploty, při které je DNA polymeráza schopna prodlužovat primery přidáváním nukleotidů do rozvíjejícího se řetězce DNA. Opakováním těchto kroků dochází k amplifikaci molekul DNA (Garibyan a Avashia, 2013).

Použité primery pro PCR

Pro svou práci jsem využila primery syntetizované firmou Generi Biotech. Všechny použité primery včetně jejich sekvencí jsem uvedla v tabulce 1.

Primery od výrobce vždy přijdou v lyofilizovaném stavu a musí být naředěny na koncentraci 100 pmol/μl PCR vodou. Tento zásobní roztok primeru jsem naředila na koncentraci 10 pmol/μl – do řádně označených mikrozkušavek jsem napipetovala 5 μl zásobního roztoku primeru a 45 μl PCR vody.

Tabulka 1. Sekvence primerů použitých pro PCR

<i>Primer</i>	<i>Sekvence</i>	<i>Délka</i>
BRCA1 exon 10/8 F	5' – TGGCACTCAGGAAAGTATCT – 3'	20 bp
BRCA1 exon 10/8 R	3' – ACAAAACCTAGAGCCTCCTTTGA – 5'	23 bp
BRCA1 exon 10/12 F	5' – GGAGTCCTAGCCCTTTCACC – 3'	20 bp
BRCA1 exon 10/12 R	3' – GCTCCCCAAAAGCATAAACA – 5'	20 bp
BRCA1 exon 19 F	5' – TGCTCCACTTCCATTGAAG – 3'	19 bp
BRCA1 exon 19 R	3' – AATCCAAATTACACAGCCTCTC – 5'	22 bp
BRCA2 exon 11/17 F	5' – TTGAAGGTGGTTCTTCAGAA – 3'	20 bp
BRCA2 exon 11/17 R	3' – CATACCAAGTCTACTGAATAAACAC – 5'	25 bp

Zdroj: vlastní

Pracovní postup:

Nejdříve jsem si řádně popsala 0,2 ml PCR mikrozkušavky. Do každé mikrozkušavky jsem odpipetovala 1,5 µl primeru forward, 1,5 µl primeru reverse, 7,5 µl MasterMixu a 2–3 µl DNA v závislosti na její koncentraci. Dále jsem mikrozkušavky doplnila PCR vodou do celkového objemu 15 µl. Poté jsem mikrozkušavky zvortexovala, stočila, umístila do cycleru a nastavila program podle teplotního profilu uvedeného v tabulce 2.

Tabulka 2. Teplotní profil PCR

<i>Proces</i>	<i>Teplota</i>	<i>Doba</i>	<i>Počet cyklů</i>
Počáteční denaturace	95 °C	10 min	1
Denaturace	95 °C	30 s	35
Annealing	60 °C	30 s	
Extenze	72 °C	1 min	
Konečná extenze	72 °C	10 min	1
Chlazení	12 °C	12 hod	1

Zdroj: vlastní

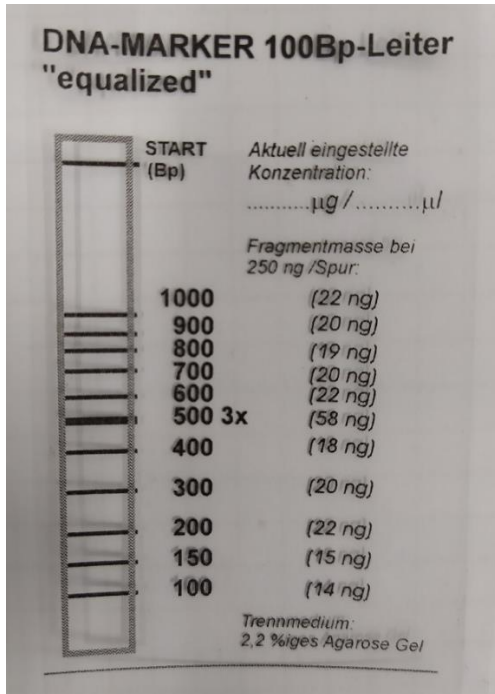
8.5 Elektroforéza PCR produktů

Elektroforéza se využívá pro separaci proteinů, DNA či RNA. Nukleové kyseliny jsou záporně nabitě molekuly oddělovány na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Nukleové kyseliny se pohybují od katody k anodě. Pohyblivost molekul závisí na jejich molekulové hmotnosti – menší molekuly se v daném nosiči (v tomto případě v gelu) pohybují rychleji než větší molekuly. V gelu se tedy nejrychleji pohybují molekuly s nízkou molekulovou hmotností. K vizualizaci oddělených molekul se využívají barviva ethidium bromid nebo SYBR green a ke konečnému zviditelnění je nutné gel prosvítit UV zářením (Magdeldin, 2012). Gelovou elektroforézu jsem využila pro ověření, zda amplifikace vybraného úseku DNA proběhla v pořádku.

Pracovní postup:

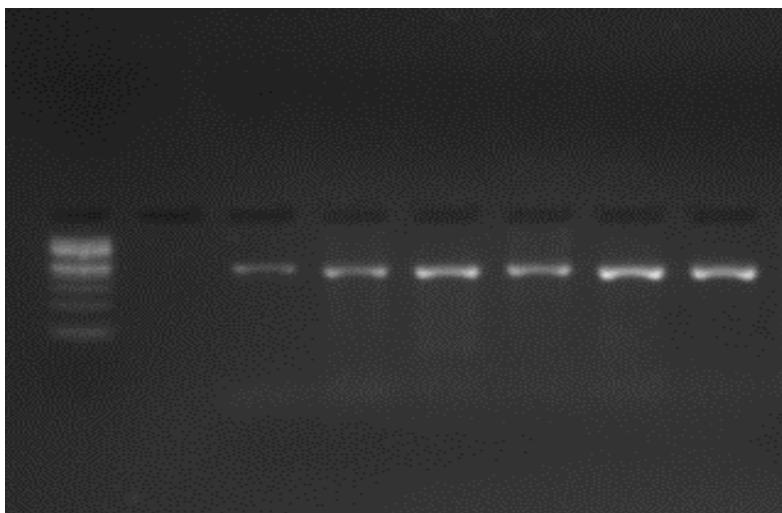
Začala jsem přípravou 3% agarózového gelu. Pro přípravu gelu jsem nejprve do baňky navázila 3 g agarózy a přilila 100 ml 1xTBE. Poté jsem baňku zahřívala

v mikrovlnné troubě, dokud jsem se nezbavila bublin. Obsah baňky jsem průběžně promíchávala. Baňku jsem ochladila proudem studené vody, přidala 10 μl ethidium bromidu (s touto chemikálií jsem pracovala v rukavicích a velice opatrně, protože je to nebezpečný karcinogen) a promíchala. Poté jsem gel nalila do formy, umístila jsem hřebínek, který vytvořil v gelu jamky a nechala ho ztuhnout. Mezitím jsem do elektroforetické vany nalila elektrolyt, kterým byl v tomto případě TBE pufr. Ztuhlý gel jsem umístila do elektroforetické vany. Následně jsem do první jamky napipetovala 5 μl 100bp DNA ladderu (obr. 2), tzv. žebřík a do dalších jamek 5 μl jednotlivých PCR produktů. Poté jsem nasadila víko na elektroforetickou vanu, ke které jsem následně připevnila elektrody a připojila ke zdroji. Proud postupoval od katody směrem k anodě. Elektroforéza probíhala při 110 V po dobu 35 minut. Po doběhnutí elektroforézy jsem odpojila elektrody a sundala víko z elektroforetické vany. Gel jsem přemístila na UV transluminátor, kde jsem ho prosvítla UV zářením. Nakonec jsem gel vyfotografovala (obr. 3) a zlikvidovala. Barvivo ethidium bromid navázané na DNA fragmenty při prosvícení gelu UV zářením zviditelnilo PCR produkty. Díky tomu jsem z fotografie gelu dokázala určit, zda PCR proběhla správně.



Obrázek 2. Použitý DNA ladder – 100 bp

Zdroj: vlastní



Obrázek 3. Fotografie gelu po proběhnuté elektroforéze PCR produktů

Zdroj: vlastní

8.6 Přečištění PCR produktů

Pracovní postup:

Do 0,2 ml mikrozkušavek jsem napipetovala 5 μ l PCR produktu, 0,5 μ l EXO I a 1 μ l rSAP. Poté jsem obsah mikrozkušavek zvortexovala, krátce stočila, umístila je do cycleru a zapnula program EXO s teplotním profilem uvedeným v tabulce 3. Tento program zahrnoval inkubaci vzorků a následnou inaktivaci enzymů.

Tabulka 3. Teplotní profil PCR – program EXO

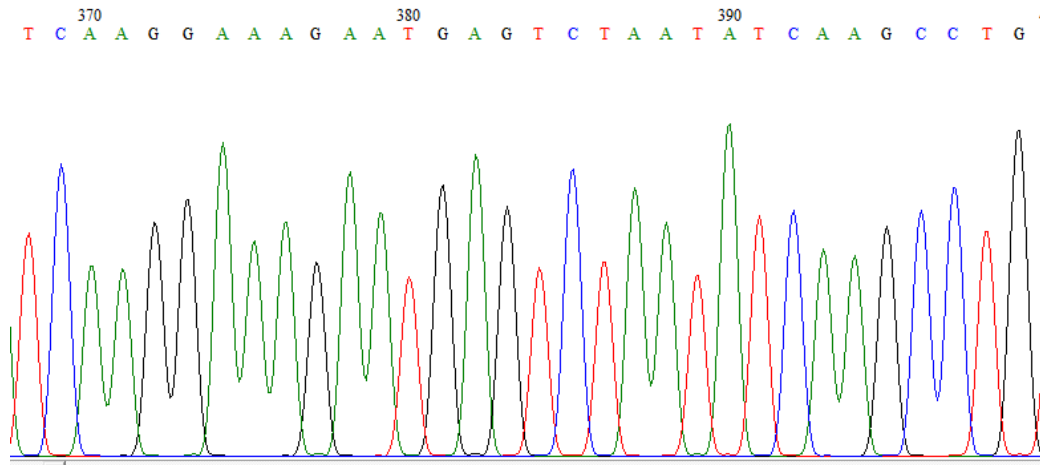
<i>Proces</i>	<i>Teplota</i>	<i>Doba</i>
Inkubace	37 °C	15 min
Inaktivace enzymů	80 °C	15 min

Zdroj: vlastní

8.7 Příprava na sekvenaci

Označila jsem si 1,5 ml mikrozkušavky čárovým kódem přímo od firmy Genseq. Druhou část kódu jsem si vlepila do sešitu k popisu příslušných vzorků. Do 1,5 mikrozkušavek jsem napipetovala 5 μ l primeru (do jedné mikrozkušavky primer F a do druhé R), 1 μ l přečištěného PCR produktu (pokud na elektroforeogramu byly slabší pruhy amplifikovaných úseků DNA, tak jsem přidala 1,5 μ l) a doplnila PCR vodou do

celkového objemu 10 μ l. Následně jsem zkumavky řádně uzavřela a vložila do schránky firmy Genseq s.r.o. a nechala vzorky osekvenovat formou služby u této firmy. Na obrázku 4 je část sekvence exonu 10/8 BRCA1 genu zdravého jedince bez mutace.



Obrázek 4. Ukázka části sekvence bez mutace (gen BRCA1 exon 10/8)

Zdroj: vlastní

8.8 Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování je také nazýváno jako dideoxy sekvenování a spočívá v prodlužování sekvence primerů pomocí DNA polymerázy a je ukončeno zařazením značeného ddNTP. Před provedením sekvenace je nutné nejdříve provést denaturaci dvoušroubovicové struktury DNA na jednotlivá vlákna, čehož lze dosáhnout zahřátím vzorku. Následně se na jedno z vláken naváže krátký primer, čímž je zajištěno, že dojde k sekvenaci pouze jednoho řetězce DNA. Navázaný primer má směr 5' → 3', z toho důvodu na jeho 3' konci dojde k zahájení syntézy nového vlákna podle templátového vlákna DNA, které má směr 3' → 5' (Kuciel a Urban, 2016)

Dříve se sekvenace prováděla následujícím způsobem (Kuciel a Urban, 2016). Reakce probíhala ve 4 zkumavkách (Campbell a Reece, 2006), každá z nich obsahovala jednořetězcovou DNA, primer, deoxynukleotidy (dATP, dTTP, dGTP a dCTP), DNA polymerázu (Kuciel a Urban, 2016) a jeden specifický radioaktivně značený dideoxynukleotid (ddATP, ddTTP, ddGTP a ddCTP) (Campbell a Reece, 2006). Dideoxynukleotidy mají na třetím uhlíku místo OH skupiny vodík (H), čímž se liší od deoxynukleotidů. V reakci musel být nadbytek dNTP nad ddNTP (přibližně v poměru 100 : 1) kvůli zajištění správného průběhu klasické syntézy DNA (Snustad, 2017). Díky

radioaktivnímu ddNTP bylo snadné detekovat poslední zařazený nukleotid. Při reakci vzniklo velké množství různě dlouhých vláken. Jednotlivá vlákna byla syntetizována pomocí DNA polymerázy, která zařazovala dNTP do nově vznikajícího vlákna, jehož syntéza byla ukončena náhodným zařazením ddNTP, což vedlo k neschopnosti připojit další nukleotid do nově vznikajícího vlákna. Výsledkem této reakce byly DNA fragmenty ukončeny radioaktivně značenými ddNTP. Následovala separace DNA fragmentů pomocí gelové elektroforézy, při níž došlo k rozdělení těchto fragmentů (Kuciel a Urban, 2016), jejichž délka byla odlišná vždy o jeden nukleotid, a k identifikaci typu posledních značených ddNTP se používala autoradiografie (technika k průkazu radioaktivních proužků) (Campbell a Reece, 2006).

V dnešní době již existují přístroje pro automatizované sekvenování. Tyto přístroje umožňují provedení celé sekvenační reakce pouze v jedné zkumavce (Kuciel a Urban, 2016), a to především díky nahrazení gelové elektroforézy za kapilární (Swerdlow a Gesteland, 1990) a možnosti použití fluorescenčních barev pro značení ddNTP (Campbell a Reece, 2006). Po proběhnutí sekvenační reakce je využito právě kapilární elektroforézy a laserového zařízení k zachycení signálu z fluorescenčně značeného ddNTP (každý nukleotid je značený jinou fluorescenční barvou). Výsledkem je elektroforeogram s barevnými píky, jejichž vrcholy jsou podle barvy přiřazeny k jednotlivým nukleotidům a na základě toho jsou barevné vrcholy automaticky převedeny do sekvence bází. Z elektroforeogramu je tedy patrná sekvence vlákna DNA, kterou je možné vyhodnotit srovnáním s genetickou databází (Kuciel a Urban, 2016).

8.9 MLPA

MLPA je technika používaná k detekci nebalancovaných změn v genomu, tedy intragenových delecí a duplikací (Bunyan et al., 2004). Tato metoda umožňuje vyšetřit počet kopií kódujících oblastí, tedy exonů, daného genu (Ewald et al., 2009). MLPA je jednoduchá, multiplexní PCR technika, která používá jediný pár primerů k amplifikaci až 60 sond, z nichž je každá určena k detekci specifické sekvence DNA (MLPA: Gold Standard for DNA Copy Number Determination, 2020). MLPA probíhá v 5 krocích. V prvním kroku dochází k denaturaci přečištěné DNA, poté se přes noc nechá zdenaturovaná DNA inkubovat se směsí MLPA sond. Každá sonda je složena ze dvou částí: z levého a pravého oligonukleotidu. Každý oligonukleotid obsahuje hybridizační sekvenci pro PCR primer, pravý oligonukleotid navíc zahrnuje vycpávkovou

sekvenci, která dává každé sondě jedinečnou délku, čímž umožňuje odlišení jednotlivých sond. V této fázi oba oligonukleotidy hybridizují na sousedící cílové sekvence DNA. Druhý krok zahrnuje ligaci sond enzymem ligázou, která proběhne pouze v případě, že oligonukleotidy nasedly na bezprostředně sousedící cílové sekvence. Z tohoto důvodu je ligace vysoce specifickou reakcí. Následně jsou ve třetím kroku všechny ligované sondy amplifikovány metodou multiplexní PCR (Principle of MLPA, 2020), která probíhá v termocykleru za použití jediného univerzálního páru primerů (MLPA[®] General Protocol, 2019). Jeden z PCR primerů je fluorescenčně značený a druhý je neznačený. Fluorescenční značení umožňuje vizualizaci amplifikovaných produktů při separaci fragmentů, kdy získáme elektroforeogram specifický pro daný vzorek (MLPA[®] General Protocol, 2019). Ve čtvrtém kroku dochází k separaci fragmentů kapilární elektroforézou, kde jsou PCR produkty rozděleny podle jejich délky (Principle of MLPA, 2020). Výsledkem kapilární elektroforézy je elektroforeogram (MLPA[®] General Protocol, 2019). Poslední fází je analýza dat pomocí speciálního software (Principle of MLPA, 2020).

Pracovní postup:

Optimální množství lidské DNA je 50–100 ng v 5 μ l vzorku DNA pro každou MLPA reakci. Nejdříve se označily zkumavky, do kterých se napipetovalo 5 μ l vzorku DNA a v případě referenčních roztoků (bez DNA) se do zkumavek napipetovalo 5 μ l TE. Zkumavky se umístily do termocykleru a zahřívaly se po dobu 5 minut na teplotu 98 °C, aby došlo k denuraci DNA (MLPA[®] General Protocol, 2019).

Poté se vzorky ochladily na pokojovou teplotu, vyndaly se z termocykleru a v laminárním boxu se do každé zkumavky přidaly 3 μ l hybridizačního Master Mixu, který byl připraven pro každou reakci smícháním 1,5 μ l MLPA pufru a 1,5 μ l směsi MLPA sond, poté byla tato směs řádně promíchána pipetou. Následně se vzorky inkubovaly 1 minutu při 95 °C, poté se teplota snížila na 60 °C a při této teplotě probíhala hybridizace po dobu 16 hodin (MLPA[®] General Protocol, 2019).

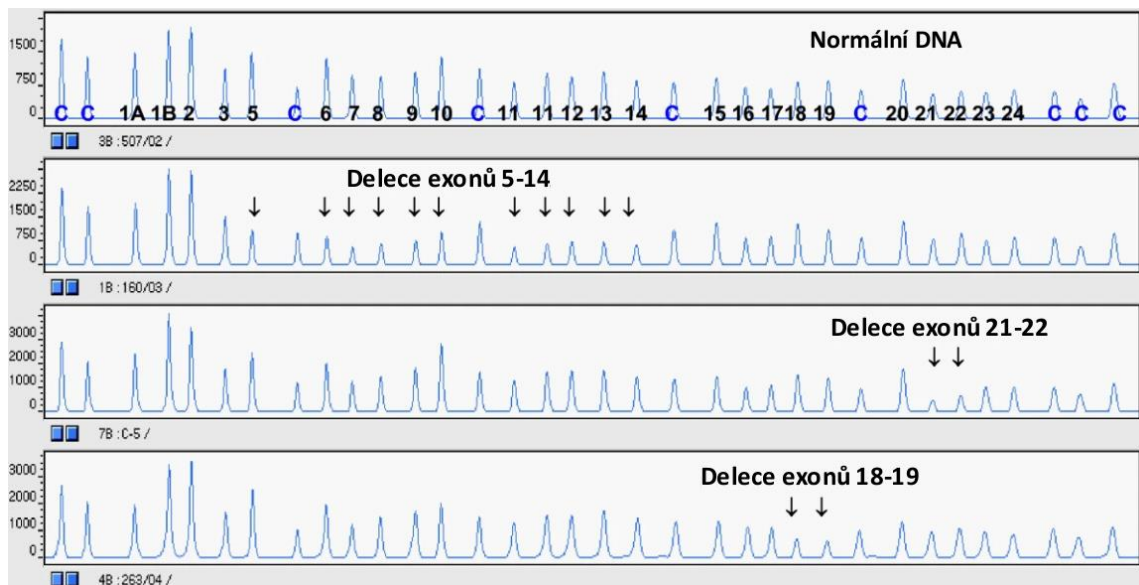
Poté se v laminárním boxu připravil Master Mix s enzymem ligázou-65 – pro každou reakci se smíchalo 25 μ l PCR vody, 3 μ l ligázového pufru A, 3 μ l ligázového pufru B, poté se přidal 1 μ l enzymu ligázy-65 a směs se dobře promíchala pipetováním. Po hybridizaci se snížila teplota v termocykleru na 54 °C. Do každé zkumavky se přidalo 32 μ l Master Mixu s enzymem ligázou-65 a opět řádně promíchalo pomocí pipety. Poté se vzorky inkubovaly 15 minut při 54 °C a následovala inaktivace enzymu ligázy-65

zvýšením teploty na 98 °C, která byla udržována po dobu 5 minut. Poté se vzorky ochladily na pokojovou teplotu (MLPA[®] General Protocol, 2019).

V laminárním boxu se připravil polymerázový Master Mix – pro každou reakci se smíchalo 7,5 µl PCR vody, 2 µl SALSA PCR směsi primerů, poté se přidalo 0,5 µl SALSA polymerázy a pomocí pipety se roztok promíchal. Následně se přidalo do každé reakce 10 µl polymerázového Master Mixu o pokojové teplotě, poté se zkumavky přemístily do cykleru a byla zahájena PCR s 35 cykly, kdy jeden cyklus probíhal podle následujícího teplotního profilu – 95 °C po dobu 30 sekund, 60 °C po dobu 30 sekund, 72 °C po dobu 60 sekund. Po proběhnutí těchto 35 cyklů následovalo zahřátí na 72 °C a inkubace při této teplotě po dobu 20 minut a poté ochlazení na 15 °C, kdy byla reakce ukončena (MLPA[®] General Protocol, 2019).

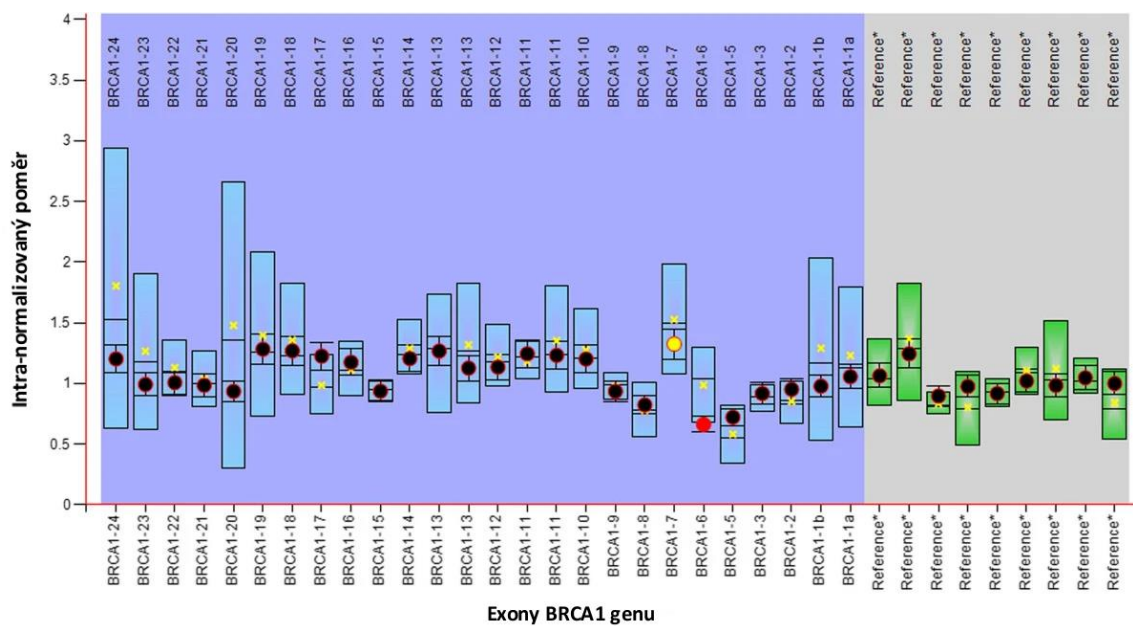
Po proběhnutí PCR reakce byly odděleny jednotlivé fragmenty metodou kapilární elektroforézy. Posledním krokem byla analýza dat pomocí speciálního programu, firma MRC Holland doporučuje bezplatný software *coffalyser.net* (MLPA[®] General Protocol, 2019). Tento program stanoví relativní počet kopií exonů vyšetřovaného genu, tak že porovná výšky píků referenčních a cílových sond ve vyšetřovaných vzorcích s těmi ve vzorcích referenčních se známým počtem kopií (Principle of MLPA, 2020).

Vyšetření vzorků MLPA metodou jsem si nemohla vyzkoušet, z toho důvodu jsem si metodu nastudovala z odborných článků. Z protokolu od MRC Holland jsem vybrala na ukázkou dva výsledky MLPA analýzy, které jsou zobrazeny na obrázku 5. Jedná se o výstupy z kapilární elektroforézy a programu *Coffalyser.net*. Každý typ výstupu zahrnuje dva grafy – jeden pro referenční vzorek a druhý pro vyšetřovaný vzorek. V horní části obrázku jsou elektroforeogramy, kde jsou vyobrazeny jednotlivé píky a každý pík znázorňuje specifickou MLPA sondu a v grafu vyšetřovaného vzorku je patrný pokles dvou cílových sond (jedná se o sondy v červených kroužcích). Vyhodnocení tohoto grafu se provádí vizuálně, porovnáním výšek píků u referenčních a vyšetřovaných vzorků, a následně pomocí speciálního programu *Coffalyser.net*, jehož výstupy jsou zobrazeny v dolní části obrázku a znázorňují relativní počet kopií. Ve výstupu vyšetřovaného vzorku z programu *Coffalyser.net* je patrná heterozygotní delece u prvních dvou cílových sond. V grafech jsou jako T (target) označeny sondy cílové a R (reference) jsou sondy referenční. Tyto grafy neznázorňují analýzu *BRCA* genů, jedná se pouze o vzorové výsledky, které jsem použila pro stručné vysvětlení, jak se provádí interpretace výsledků MLPA analýzy.



Obrázek 6. Elektroforeogramy zobrazující exony *BRCA1* genu z vyšetření MLPA metodou

Zdroj: Vašíčková et al., 2007



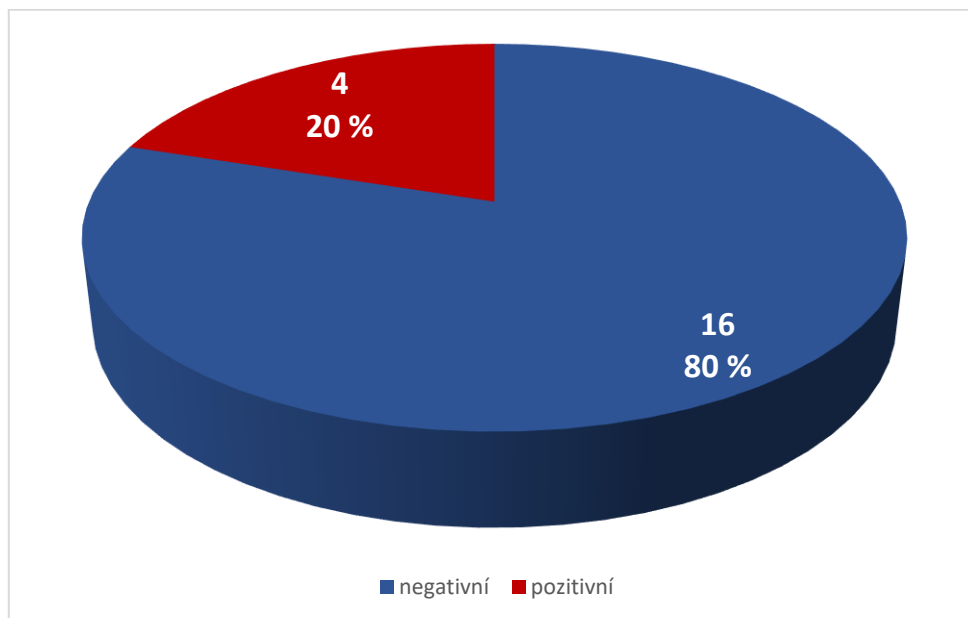
Obrázek 7. Výstup z programu Coffalyser.net pro *BRCA1* gen analyzovaný MLPA metodou

Zdroj: De Silva et al., 2014

9 Výsledky

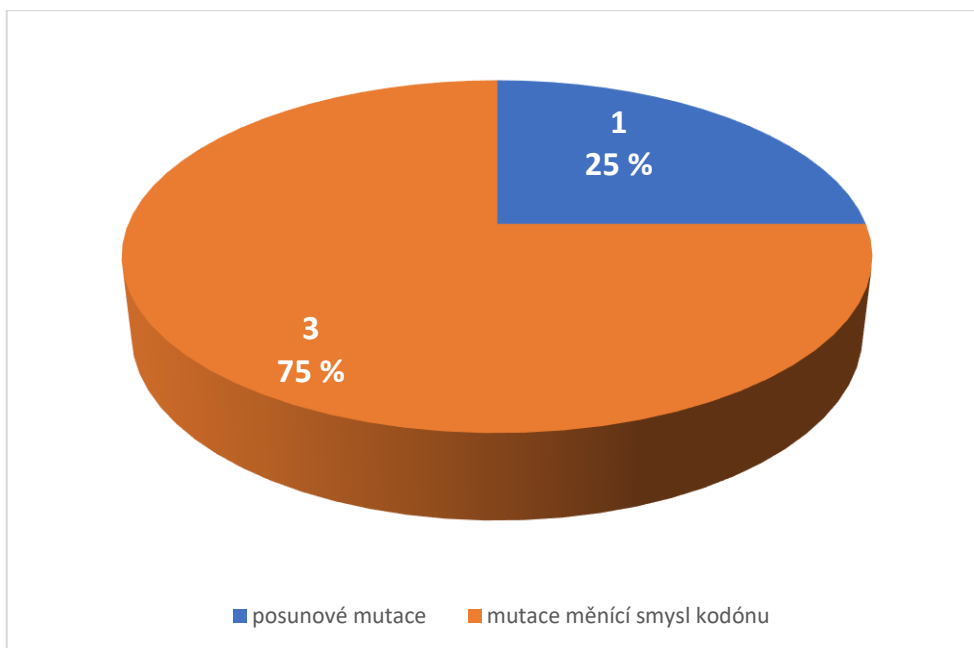
Vyšetřila jsem 20 vzorků převážně od jedinců z jihočeského kraje pomocí metody Sangerova sekvenování. Z celého souboru vzorků byla přítomna mutace u 4 vzorků, ostatní byly negativní.

V grafu 2 jsem uvedla početní a procentuální zastoupení pozitivních a negativních výsledků v souboru vyšetřovaných vzorků, které jsem získala srovnáním sekvencí ze Sangerova sekvenování s NCBI. Dále jsem nalezené mutace rozčlenila podle jejich vlivu na strukturu DNA, jejíž změna může ovlivnit výslednou sekvenci a funkci bílkovinného produktu (graf 3). V grafu 4 jsem uvedla další možné rozdělení mutací, a to dle jejich klinického významu.



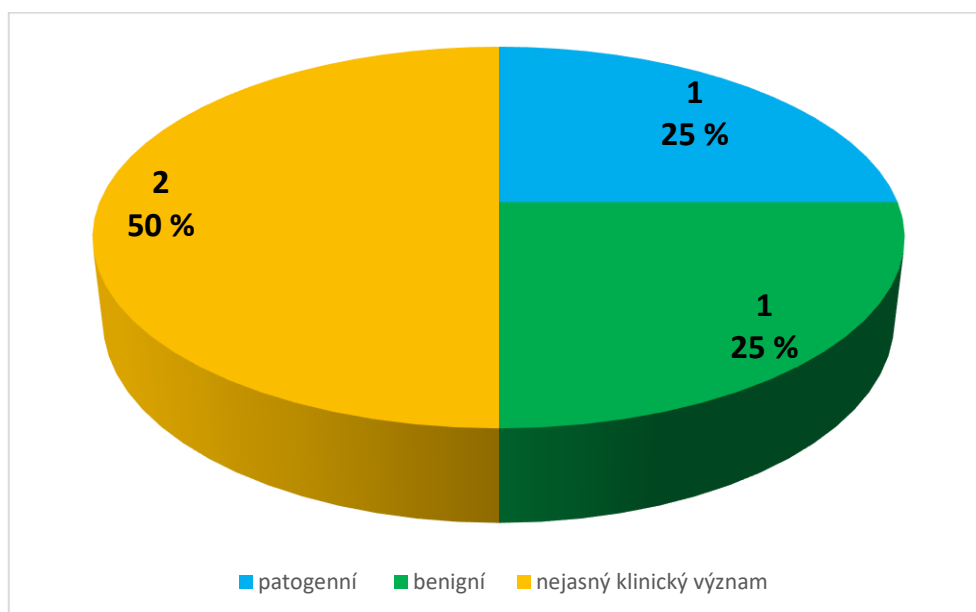
Graf 2. Zastoupení pozitivních a negativních výsledků získaných metodou Sangerova sekvenování

Zdroj: vlastní



Graf 3. Rozčlenění mutací podle jejich vlivu na strukturu DNA a výsledný bílkovinný produkt

Zdroj: vlastní

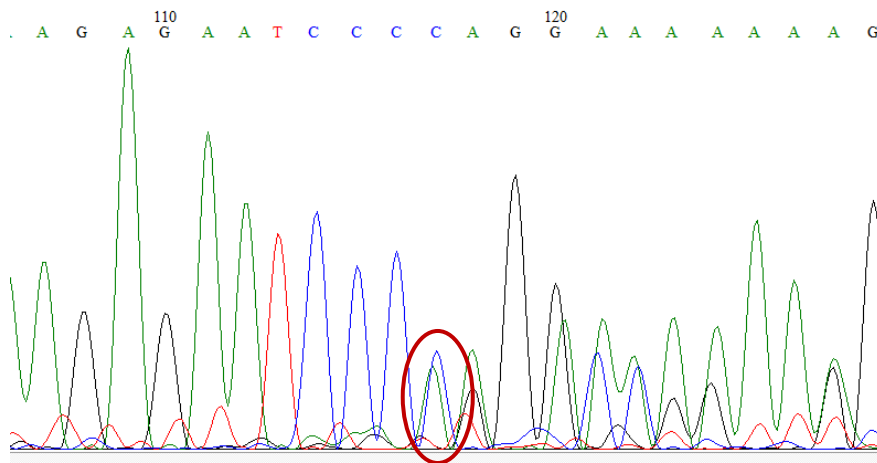


Graf 4. Rozčlenění mutací podle jejich klinického významu

Zdroj: vlastní

Nalezené mutace jsem klasifikovala srovnáním s genovou bankou NCBI. Jedna z nich byla způsobena duplikací nukleotidu a ostatní jednonukleotidovými záměnami. Mutace, která byla způsobena duplikací nukleotidu patří mezi posunové mutace neboli

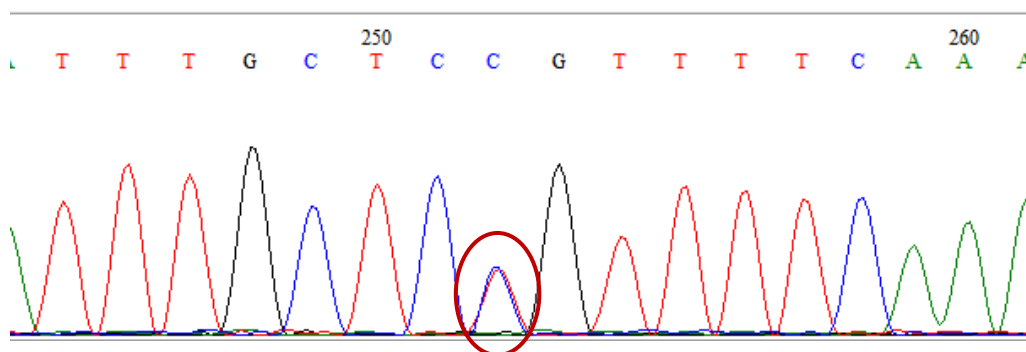
frameshift a je patogenní, jedná se o variantu **NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC** (p.Gln1756Profs), která je znázorněna na obrázku 8.



Obrázek 8. Varianta c.5266dupC (horní vlákno DNA)

Zdroj: vlastní

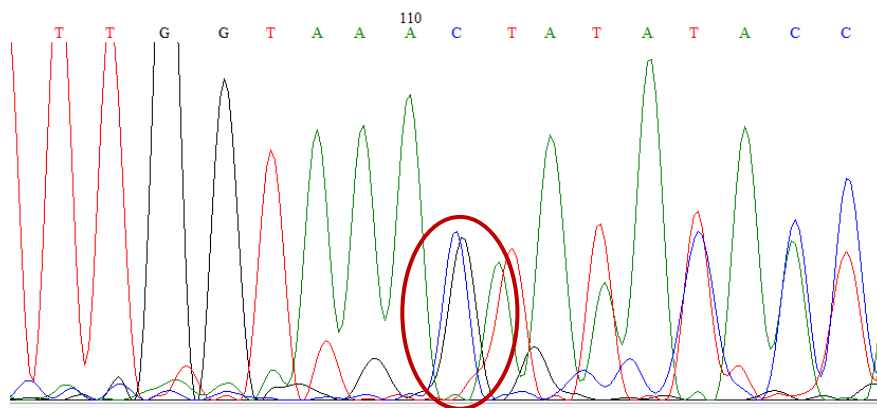
Další z nalezených mutací byla varianta **NM_007294.4(BRCA1):c.2612C>T** (p.Pro871Leu) řadící se mezi missense, tedy mutace měnící smysl kodónu (dochází ke změně nukleotidu v kodónu, vzniká tak jiný kodón, což vede k zařazení jiné aminokyseliny) a je klasifikována jako benigní (obr. 9).



Obrázek 9. Varianta c.2612C>T (horní vlákno DNA)

Zdroj: vlastní

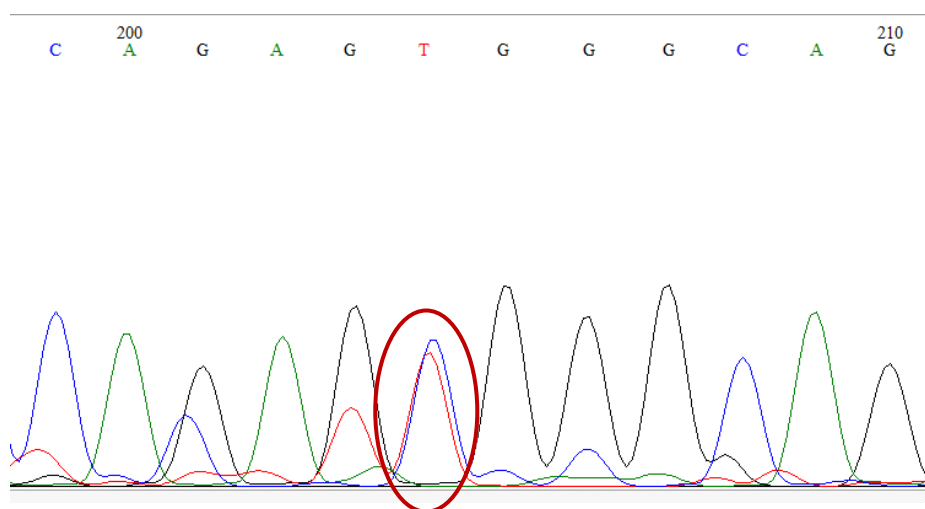
V souboru vzorků jsem dále našla variantu **NM_007294.4(BRCA1):c.3700G>C** (p.Val1234Leu) patřící také mezi missense a má zatím nejasný význam, tudíž se řadí mezi varianty s nejasným významem neboli VOUS (obr. 10).



Obrázek 10. Varianta c.3700G>C (horní vlákno DNA)

Zdroj: vlastní

Poslední nalezenou mutací byla **NM_007294.4(BRCA1):c.2663A>G** (p.His888Arg) a stejně jako dvě předchozí mutace je řazena mezi missense, v databázi NCBI byla tato varianta interpretována pouze jedenkrát a její význam je nejasný, proto patří také mezi VOUS, stejně jako výše zmíněná varianta **NM_007294.4(BRCA1):c.3700G>C**. Tato varianta je znázorněna na obrázku 11.



Obrázek 11. Varianta c.2663A>G (spodní vlákno DNA)

Zdroj: vlastní

Žádný z těchto výsledků nebyl nikomu sdělen.

10 Diskuse

Při provádění praktické části bakalářské práce v laboratoři došlo u 10 vzorků ke komplikacím. Při izolaci nebyl pravděpodobně odstraněn veškerý ethanol v těchto vzorcích a zbytkový ethanol způsobil inhibici amplifikace. To znamená, že ve vzorcích nedošlo k namnožení kopií vybraného úseku DNA. Analýzu u těchto 10 vzorků jsem neopakovala z časových a finančních důvodů.

Největší pravděpodobnost nálezů patogenních mutací je předpokládána u jedinců s rodinnou anamnézou karcinomu prsu či ovaria. V případě souboru mých vzorků má tedy nález mutace velmi nízkou frekvenci, protože jsem náhodně vybrala skupinu jedinců, kteří nejsou zatíženi rodinnou ani osobní anamnézou.

Výskyt karcinomu prsu se liší i v závislosti na pohlaví. V souboru vyšetřovaných vzorků byla proto zastoupena v menší míře i mužská část populace. Podle studie Lukešové a kol. (2006) v České republice dochází k manifestaci karcinomu prsu u mužů výrazně méně než u žen. Jejich studie zahrnovala vyšetření 14 mužů s karcinomem prsu a mutace v *BRCA* genech byla nalezena u 4 mužů, tedy u 28,6 %, z toho muži s mutací v *BRCA1* genu tvořili 7,1 % a mužů s mutací v *BRCA2* genu bylo více, a to 21,4 %. V mém souboru vzorků jsem u mužské populaci nenalezla žádnou mutaci, všechny nalezené mutace patřily ženské části populace.

Vyšetřovala jsem u 11 vzorků exon 10/8 *BRCA1* genu, u 1 vzorku exon 10/12 *BRCA1* genu, u 2 vzorků exon 19 *BRCA1* genu a u 6 vzorků exon 11/17 *BRCA2* genu.

Jedinci s negativními výsledky neměli v daném úseku genu mutovanou alelu, tudíž je u nich riziko karcinomu nižší. Pro snížení rizika karcinomu na úroveň běžné populace je však nutné vyšetřit celý gen pomocí metody NGS. Tato metoda je v porovnání se Sangerovým sekvenováním velice jednoduchá, rychlá a méně nákladná. NGS zvládne vyšetřit celý gen v jedné reakci. V případě mých laboratorních podmínek nebylo možné provést vyšetření metodou NGS a vyšetření celého genu metodou Sangerova sekvenování by bylo časově náročné a velice nákladné, proto jsem vyšetření provedla pouze u vybraných úseků *BRCA* genů.

V případě jednoho vzorku v exonu 19 *BRCA1* genu jsem objevila variantu **c.5266dupC**, která představuje nejčastější mutaci v české populaci (Foretová et al., 2004).

U variant s nejasným klinickým významem se přikláním spíše k benigní variantě, protože rodinná ani osobní anamnéza jedinců nebyla zatížena hereditární ani sporadickou formou karcinomu. Jednalo se celkem o dvě varianty s nejasným klinickým významem,

a to o variantu **c.2663A>G** přítomnou na exonu 10/8 *BRCA1* genu a variantu **c.3700G>C** na exonu 10/12 *BRCA1* genu. Varianta **c.2663A>G** byla v NCBI popsána pouze jednou a není blíže specifikována, což bylo také jedním z důvodů mého přiklonění k benignímu významu této mutace.

Varianta **c.2612C>T** na exonu 10/8 *BRCA1* genu byla v databázi NCBI ve většině případů klasifikována jako benigní, proto jsem mutaci vyhodnotila také jako benigní.

Interpretace výsledků může být v případě procentuálního zastoupení variant zkreslena z důvodu malého objemu dat v souboru vzorků.

Na genetické vyšetření karcinomu prsu existuje spousta odlišných názorů. Dle mého názoru má genetické testování své výhody i nevýhody. Za pozitivum považuji možnost učinit určitá preventivní opatření v případě pozitivního výsledku. A jako hlavní negativum vnímám stav, kdy se pacientka dozví o pozitivním výsledku, což by pro ni mohlo být stresující situací, a právě stres je jedním z rizikových faktorů nádorových onemocnění. S těmito okolnostmi je pacientka seznámena při konzultaci na genetickém pracovišti a zda vyšetření podstoupí záleží pouze na ní, což je podle mě správný postup. Toto je pouze můj osobní názor na mutační analýzu hlavních predispozičních genů pro karcinom prsu u pacientek se zatíženou rodinnou či osobní anamnézou.

11 Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem vypracovala odbornou rešerši a seznámila se tak s nejčastějším hereditárním karcinomem u žen v české populaci – karcinomem prsu, jeho predispozičními geny, kterými jsou především *BRCA* geny a následně i s metodami používanými k jejich vyšetření. Dále jsem připravila vzorky k následnému provedení sekvenace. Získané sekvence jsem zpracovala v programu BioEdit a provedla klasifikaci nalezených mutací v genetické databázi NCBI. S vyšetřovací metodou MLPA jsem se seznámila prostřednictvím odborné literatury. Naplnila jsem tedy všechny stanovené cíle.

Celkem jsem odebrala a odizolovala 30 vzorků DNA, následně u všech provedla PCR, ale amplifikace proběhla pouze u 20 vzorků, což jsem zjistila pomocí elektroforézy. Tyto amplifikované vzorky jsem odeslala k sekvenaci. Vzorky, u kterých po elektroforéze na gelu nebyl patrný žádný PCR produkt, jsem k sekvenaci neodesílala. Provedla jsem tedy vyhodnocení 40 sekvencí (každý vzorek měl 2 sekvence – horní a spodní vlákno DNA). V souboru vyšetřovaných vzorků jsem objevila 4 mutace. Jedna byla patogenní (**c.5266dupC**), jedna benigní (**c.2612C>T**) a dvě s nejasným významem (**c.3700G>C**, **c.2663A>G**).

Celý proces vyšetření metodou MLPA jsem si měla osvojit v genetické laboratoři Pronatal v Praze, ale jak jsem již uvedla, tak mi to z důvodu současné situace nebylo umožněno. Výsledný záznam získaný touto analýzou jsem si řádně prostudovala na stránkách firmy MRC Holland. Z prostudovaných materiálů jsem zjistila, že MLPA je velice přínosnou metodou ke stanovení nebalancovaných mutací, tedy duplikací či delecí velkých úseků DNA.

Hlavním přínosem mé bakalářské práce bylo, že jsem se naučila samostatně pracovat v laboratoři a pochopila základy některých molekulárních metod.

12 Seznam použitých zdrojů

1. BAJČIOVÁ, V., 2015. K nádorům predisponující syndromy v dětském věku-role pediatra primárního kontaktu. *Pediatric pro praxi*. [online]. **16**(5), 300–304 [cit. 2019-07-31]. ISSN 1803-5264. Dostupné z: https://www.pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-201505-0003_K_nadorum_predisponujici_syndromy_v_detskem_veku-role_pediatra_primarniho_kontaktu.php
2. BUNYAN, D., ECCLES, D., SILLIBOURNE, J., et al, 2004. Dosage Analysis of Cancer Predisposition Genes by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *British Journal of Cancer*. [online]. **91**(6), 1155–1159 [cit. 2020-03-16]. doi: 10.1038/sj.bjc.6602121. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/6602121#Abs1>
3. CAMPBELL, N.A., REECE, J.B., 2006. *Biologie*. Brno: Computer Press. ISBN 80-251-1178-4.
4. CIBULA, D. a PETRUŽELKA L., 2009. *Onkogynekologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2665-6.
5. CLARK, S. L., RODRIGUEZ, A.M., SNYDER, R.R, HANKINS, G.D V. a BOEHNING, D., 2012. Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1. *Computational and structural biotechnology journal*. [online]. **1**(1), 1–8 [cit. 2019-08-08]. doi: 10.5936/csbj.201204005. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3380633/?fbclid=IwAR1qiuw4C7Y9gez_K7RtbnN6ipUrbezYClS YG65bI7h_msj_kLaVmD2dvoE
6. COUFAL, O. a FAIT, V., 2011. *Chirurgická léčba karcinomu prsu*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3641-9.

7. DAVIES, A., MASSON, J.-Y., MCILWRAITH, M., STASIAK, A., STASIAK, A., VENKITARAMAN, A., WEST, S., 2001. Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein. *Molecular Cell*. [online]. **7**(2), 273–282 [cit. 2019-08-20]. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00175-7. Dostupné z: [https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765\(01\)00175-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276501001757%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765(01)00175-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276501001757%3Fshowall%3Dtrue)

8. DE SILVA, S., TENNEKOON, K. H., KARUNANAYAKE, E. H., AMARASINGHE, I., ANGUNAWELA, P., 2014. Analysis of BRCA1 and BRCA2 Large Genomic Rearrangements in Sri Lankan Familial Breast Cancer Patients and at Risk Individuals. *BMC Research Notes*. [online]. **7**(344) [cit. 2020-05-14]. doi: 10.1186/1756-0500-7-344. Dostupné z: <https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-344#citeas>

9. DRAŽAN, L. a MĚŠŤÁK, J., 2006. *Rekonstrukce prsu po mastektomii*. Praha: Grada. ISBN 80–247–1123–0.

10. EASTON, D. F., 1999. How Many More Breast Cancer Predisposition Genes are There? *Breast Cancer Research*. [online]. **1**(1), 14–17 [cit. 2019-09-04]. doi: 10.1186/bcr6. Dostupné z: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr6>

11. EWALD, I. P., RIBEIRO, P. L. I., PALMERO, E. I., COSSIO, S. L., GIUGLIANI, R., ASHTON-PROLLA, P., 2009. Genomic Rearrangements in BRCA1 and BRCA2: a Literature Review. *Genetics and Molecular Biology*. [online]. **32**(3), 437–446 [cit. 2020-03-16]. doi: 10.1590/S1415-47572009005000049. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572009000300003&lng=en&tlng=en

12. ENGELHARD, K., HOLLENBACH, H. P., WOHLFART, K. et al., 2004. Comparison of Whole-Body MRI with Automatic Moving Table Technique and Bone Scintigraphy for Screening for Bone Metastases in Patients with Breast Cancer. *European Radiology*. [online]. **14**(1), 99–105 [cit. 2019-10-27]. doi: 10.1007/s00330-003-1968-7. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00330-003-1968-7>
13. FORETOVÁ, L., 2008. Genetika nádorů prsu. *Onkologie* [online]. **2**(1), 44–48 [cit. 2019-09-05]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-200801-0009_Genetika_nadoru_prsu.php
14. FORETOVÁ, L., MACHÁČKOVÁ, E., NAVRÁTILOVÁ, M., PAVLŮ, H., HRUBÁ, M., LUKEŠOVÁ, M., VALÍK, D., 2004. BRCA1 and BRCA2 Mutations in Women with Familial or Early-Onset Breast/Ovarian Cancer in the Czech Republic. *Human Mutation* [online]. **23**(4), 397–398 [cit. 2020-02-23]. doi: 10.1002/humu.9226. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/humu.9226>
15. FORETOVÁ, L., MACHÁČKOVÁ, E., PALÁCOVÁ, M., NAVRÁTILOVÁ, M., SVOBODA, M., PETRÁKOVÁ, K., 2016. Doporučení rozšíření indikačních kritérií ke genetickému testování mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* u hereditárního syndromu nádorů prsu a ovarií. *Klinická onkologie* [online]. **29**(Suppl 1), 9–13 [cit. 2020-03-08]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/409/4868.pdf>
16. FORETOVÁ, L., NAVRÁTILOVÁ, M., MACHÁČKOVÁ, E., 2009. Limitace genetického testování v onkologii. *Klinická onkologie* [online]. **22**(Suppl 1), 65–68 [cit. 2020-03-22]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/149/3475.pdf>

17. FORETOVÁ, L., SVOBODA, M., SLABÝ, O. et al., 2014. *Molekulární genetika v onkologii*. Praha: Mladá fronta-Medical Services. ISBN 978-80-204-3236-0.
18. GARIBYAN, L. a AVASHIA, N., 2013. Polymerase Chain Reaction. *The Journal of investigative dermatology* [online]. **133**(3), 1–4 [cit. 2020-02-24]. doi: 10.1038/jid.2013.1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>
19. HASHIZUME, R., FUKUDA, M., MAEDA, I., NISHIKAWA, H., OYAKE, D., YABUKI, Y., OGATA, H., a OHTA, T., 2001. The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 is an Ubiquitin Ligase Inactivated by a Breast Cancer-Derived Mutation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **276**(18), 14537–14540 [cit. 2019-08-07]. doi: 10.1074/jbc.C000881200 Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/276/18/14537.full.pdf>
20. HATINA, J. a SYKES, B. D., 1999. *Lékařská genetika: problémy a přístupy*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0700-8.
21. CHAO, H.X., POOVEY, C.E., PRIVETTE, A.A., GRANT, G.D., CHAO, H.Y., COOK, J.G. a PURVIS, J.E., 2017. Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle. *Cell Systems* [online]. **5**(5), 445–459 [cit. 2020-03-03]. doi: 10.1016/j.cels.2017.09.015. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405471217304362?via%3Dihub>
22. CHOVANEC, J. a NÁLEŽINSKÁ, M., 2014. Přehled diagnostiky a léčby karcinomu děložního hrdla. *Onkologie* [online]. **8**(6), 269–274 [cit. 2019-08-26]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-201406-0007_Prehled_diagnostiky_a_lecby_karcinomu_delozniho_hrdla.php

23. CHOVANEC, J., DOSTÁLOVÁ, Z. a NAVRÁTILOVÁ J., 2008. Karcinom prsu-aktuální problém. *Interní Medicína pro praxi* [online]. **10**(2), 84–89 [cit. 2019-08-25]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200802-0010_Karcinom_prsu-aktualni_problem.php
24. KOLÁŘOVÁ, H., 2017. Péče o nosičky mutací genů BRCA1 a BRCA2 z hlediska onkogynekologa. *Onkologie* [online]. **11**(5), 228–230 [cit. 2019-06-12]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-201705-0004_Pece_o_nosicky_mutaci_genu_BRCA1_a_BRCA2_z_hlediska_onkogynekologa.php
25. KUCIEL, J., URBAN, T., 2016. *Principy genetiky*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-385-1.
26. LI, W. a YE, Y., 2008. Polyubiquitin Chains: Functions, Structures, and Mechanisms. *Cellular and molecular life sciences*. [online]. **65**(15), 2397–2406 [cit. 2019-08-08]. doi: 10.1007/s00018-008-8090-6. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2700825/>
27. LORICK, K.L., JENSEN, J.P., FANG, S., ONG, A.M., HATAKEYAMA, S. a WEISSMAN, A.M., 1999. RING Fingers Mediate Ubiquitin-Conjugating Enzyme (E2) – Dependent Ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [online]. **96**(20), 11364–11369 [cit. 2019-08-07]. ISSN 1091-6490. Dostupné z: <https://www.pnas.org/content/pnas/96/20/11364.full.pdf>
28. LUKEŠOVÁ, M., MACHÁČKOVÁ, E., VAŠÍČKOVÁ, P., NAVRÁTILOVÁ, M., PAVLŮ, H., URBÁNKOVÁ, V., KUKLOVÁ, J. a FORETOVÁ, L., 2006. Výsledky testování BRCA1 a BRCA2 genů v molekulárně genetické laboratoři Masarykova onkologického ústavu. *Klinická onkologie*. [online]. **19**(Suppl), 55–57 [cit. 2020-02-12]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2006-04-30-supplement/>

29. MAGDELDIN, S., 2012. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. Croatia: InTech. ISBN: 978-953-51-0458-2.
30. MARK, W.-Y., LIAO, J., LU, Y., AYED, A., LAISTER, R., SZYMCZYNA, B., CHAKRABARTTY, A. a ARROWSMITH, CH.H., 2005. Characterization of Segments from the Central Region of BRCA1: An Intrinsically Disordered Scaffold for Multiple Protein–Protein and Protein–DNA Interactions? *Journal of molecular biology*. [online]. **345**(2), 275–287 [cit. 2019-08-10]. doi: 10.1016/j.jmb.2004.10.045. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/8155305_Characterization_of_Segments_from_the_Central_Region_of_BRCA1_An_Intrinsically_Disordered_Scaffold_for_Multiple_Protein-Protein_and_Protein-DNA_Interactions
31. MASUDA, T., XU, X., DIMITRIADIS, E.K., LAHUSEN, T., DENG, CH.-X., 2016. “DNA Binding Region” of BRCA1 Affects Genetic Stability through Modulating the Intra-S-Phase Checkpoint. *International Journal of Biological Sciences*. [online]. **12**(2), 133–143 [cit. 2019-08-11]. doi: 10.7150/ijbs.14242. Dostupné z: <http://www.ijbs.com/v12p0133.htm>
32. MEZA, J.E., BRZOVIC, P.S., KING, M.-C. a KLEVIT, R.E., 1999. Mapping the Functional Domains of BRCA1: INTERACTION OF THE RING FINGER DOMAINS OF BRCA1 AND BARD1. *Journal of Biological Chemistry*. [online]. **274**(9), 5659–5665 [cit. 2019-08-07]. doi: 10.1074/jbc.274.9.5659. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/274/9/5659.full>
33. MLPA[®] General Protocol, 2019. [online]. MRC Holland. [cit. 2020-03-17]. Dostupné z: <https://www.mrcholland.com/products/4838/MLPA%20General%20Protocol%20MDP-v007.pdf>

34. MLPA: The Gold Standard for DNA Copy Number Determination, 2020. [online]. MRC Holland. [cit. 2020-03-17]. Dostupné z: <https://www.mrcholland.com/technology/mlpa>
35. NAGY, R., SWEET, K. a ENG, CH., 2004. Highly Penetrant Hereditary Cancer Syndromes. *Oncogene*. [online]. **23**(38), 6445–6470 [cit. 2019-07-31]. doi: 10.1038/sj.onc.1207714. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/1207714>
36. NASEEM, R., STURDY, A., FINCH, D., JOWITT, T. a WEBB, M., 2006. Mapping and Conformational Characterization of the DNA-binding Region of the Breast Cancer Susceptibility Protein BRCA1. *The Biochemical journal*. [online]. **395**(3), 529–535 [cit. 2019-08-19]. doi: 10.1042/BJ20051646. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1462700/>
37. *Novotvary*, 2016. [online]. ÚZIS. [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=record&id=8139>
38. POHLREICH, P., KLEIBL, Z., KLEIBLOVÁ, P., JANATOVÁ, M., SOUKUPOVÁ, J., MACHÁČKOVÁ, E., HÁZOVÁ, J., VAŠÍČKOVÁ, P., ŠTAHLOVÁ HRABINCOVÁ, E., NAVRÁTILOVÁ, M., SVOBODA, M. a FORETOVÁ, L., 2012. Klinický význam analýz genů středního rizika pro hodnocení rizika vzniku karcinomu prsu a dalších nádorů v České republice. *Klinická onkologie*. [online]. **25**(1), 59–66 [cit. 2019-09-03]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2012-08-15-supplement-1/klinicky-vyznam-analyz-genu-stredniho-rizika-pro-hodnoceni-rizika-vzniku-karcino/>
39. PRAUSOVÁ, J., 2010. Karcinom prsu – problém i v 21. století. *Interní Medicína pro praxi*. [online]. **12**(1), 26–32 [cit. 2019-06-26]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-201001-0005_Karcinom_prsu-problem_i_v_21_stoleti.php

40. Principle of MLPA, 2020. [online]. MRC Holland. [cit. 2020-03-17]. Dostupné z: <https://www.mrcholland.com/technology/mlpa/technique>
41. PUCHMAJEROVÁ, A., TORNIKIDIS, J., MRŇA, L., HAVLOVICOVÁ, M., VLČKOVÁ, M., CHRUDIMSKÁ, J., MACEK, M.Jr. a HOCH, J., 2018. Hereditární formy karcinomu prsu: genetická etiologie a současné možnosti prevence a chirurgické léčby. *Časopis lékařů českých*. **157**(2), 90–95. ISSN 0008-7335.
42. PURI N., 2011. A Study of Pathogenesis of Acanthosis Nigricans and Its Clinical Implications. *Indian J Dermatol* [online]. **56**(6), 678–683 [cit. 2019-10-17]. doi: 10.4103/0019-5154.91828. Dostupné z: <http://www.e-ijd.org/text.asp?2011/56/6/678/91828>
43. ROBERTS, S.A., SPREADBOROUGH, A.R., BULMAN, B., BARBER, J.B.P., EVANS, D.G.R. a SCOTT, D., 1999. Heritability of Cellular Radiosensitivity: A Marker of Low-Penetrance Predisposition Genes in Breast Cancer?. *The American Journal of Human Genetics*. [online]. **65**(3), 784–794 [cit. 2019-09-04]. doi: 10.1086/302544. Dostupné z: [https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297\(07\)62332-5](https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297(07)62332-5)
44. ROSEN, E., FAN, S., PESTELL, R. a GOLDBERG, I., 2003. BRCA1 Gene in Breast Cancer. *Journal of Cellular Physiology*. [online]. **196**(1), 19–41 [cit. 2019-08-21]. doi: 10.1002/jcp.10257. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.10257#>
45. SEDLÁKOVÁ, P., 2018. *Význam molekulárně genetického testování BRCA1, BRCA2 a dalších genů u pacientů s karcinomem prsu a ovarií*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita, Lékařská fakulta.

46. STRUEWING, J. P., LERMAN, C., KASE, R. G., GIAMBARRESI, T. R. a TUCKER, M. A., 1995. Anticipated Uptake and Impact of Genetic Testing in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Families. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* [online]. **4**(2), 169–173 [cit. 2019-09-05]. ISSN 1538-7755. Dostupné z: <https://cebp.aacrjournals.org/content/4/2/169.short>
47. SWERDLOW, H., GESTELAND, R., 1990. Capillary Gel Electrophoresis for Rapid, High Resolution DNA Sequencing. *Nucleic Acid Research* [online]. **18**(6), 1415–1419 [cit. 2020-03-22]. doi: 10.1093/nar/18.6.1415. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/18/6/1415/1325051>
48. ŠUBRT, I., PRESL, J. a SVOBODA, T., 2015. Možnosti a následné souvislosti vyplývající z genetického testování pacientek s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu a ovaria vlivem mutace BRCA1 a BRCA2. *Onkologie* [online]. **9**(2), 58–63 [cit. 2019-09-09]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-201502-0003_Moznosti_a_nasledne_souvislosti_vyplyvajici_z_genetickeho_testovani_pacientek_s_vysokym_rizikem_vzn.php
49. TURNBULL, C. a HODGSON, S., 2005. Genetic Predisposition to Cancer. *Clinical medicine* [online]. **5**(5), 491–498 [cit. 2019-09-05]. doi: 10.7861/clinmedicine.5-5-491. Dostupné z: <https://www.rcpjournals.org/content/clinmedicine/5/5/491>
50. VAŠÍČKOVÁ, P., MACHÁČKOVÁ, E., LUKEŠOVÁ, M., DAMBORSKÝ, J., HORKÝ, O., PAVLŮ, H., KUKLOVÁ, J., KOSINOVÁ, V., NAVRTÁILOVÁ, M., FORETOVÁ, L., 2007. High Occurrence of BRCA1 Intragenic Rearrangements in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome in the Czech Republic. *BMC Medical Genetics*. [online]. **8**(32) [cit. 2020-05-14]. doi: 10.1186/1471-2350-8-32. Dostupné z: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-8-32>

51. VENKITARAMAN, A. R., 2001. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the Biological Response to DNA Damage. *Journal of Cell Science*. [online]. **114**(20), 3591–3598 [cit. 2019-08-07]. ISSN 1527-7755. Dostupné z: <https://jcs.biologists.org/content/114/20/3591.full>
52. WEINBERGER, V., ZIKÁN, M., 2016. Karcinom prsu – specifika gynekologické péče a poradenství. *Klinická onkologie*. [online]. **29**(suppl 3), 7–15 [cit. 2020-02-21]. doi: 10.14735/amko20163S7. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2016-09-15-supplementum-3/karcinom-prsu-specifika-gynekologicke-pece-a-poradenstvi/>
53. YU, X., WU, L. C., BOWCOCK, A. M., ARONHEIM A. a BAER, R., 1998. The C-terminal (BRCT) Domains of BRCA1 Interact in Vivo with CtIP, a Protein Implicated in the CtBP Pathway of Transcriptional Repression. *Journal of Biological Chemistry*. [online]. **273**(39), 25388–25392 [cit. 2019-08-08]. doi: 10.1074/jbc.273.39.25388. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/273/39/25388.full>
54. *Zdravotnická ročenka České republiky*, 2018. [online]. ÚZIS. [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://www.uzis.scz/index.php?pg=record&id=8280>
55. ZIMOVJANOVÁ, M., 2009. Hereditární karcinom prsu. Příklad vzácnější formy karcinomu prsu v populaci. *Onkologie*. [online]. **3**(6), 348–350 [cit. 2020-03-08]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-200906-0006_Hereditarni_karcinom_prsu_Priklad_vzacnejsi_formy_karcinomu_prsu_v_populaci.php

13 Seznam tabulek, grafů a obrázků

Tabulka 1. Sekvence primerů použitých pro PCR	34
Tabulka 2. Teplotní profil PCR.....	35
Tabulka 3. Teplotní profil PCR – program EXO	37
Graf 1. Zastoupení jednotlivých druhů nádorových onemocnění.....	9
Graf 2. Zastoupení pozitivních a negativních výsledků získaných metodou Sangerova sekvenování	44
Graf 3. Rozčlenění mutací podle jejich vlivu na strukturu DNA a výsledný bílkovinný produkt.....	45
Graf 4. Rozčlenění mutací podle jejich klinického významu	45
Obrázek 1. Vývoj hereditárního a sporadického nádoru	10
Obrázek 2. Použitý DNA ladder – 100 bp.....	36
Obrázek 3. Fotografie gelu po proběhnuté elektroforéze PCR produktů.....	37
Obrázek 4. Ukázka části sekvence bez mutace (gen <i>BRCA1</i> exon 10/8).....	38
Obrázek 5. Výstupní grafy MLPA analýzy	42
Obrázek 6. Elektroforeogramy zobrazující exony <i>BRCA1</i> genu z vyšetření MLPA metodou	43
Obrázek 7. Výstup z programu Coffalyser.net pro <i>BRCA1</i> gen analyzovaný MLPA metodou	43
Obrázek 8. Varianta c.5266dupC (horní vlákno DNA).....	46
Obrázek 9. Varianta c.2612C>T (horní vlákno DNA).....	46
Obrázek 10. Varianta c.3700G>C (horní vlákno DNA).....	47
Obrázek 11. Varianta c.2663A>G (spodní vlákno DNA).....	47

14 Seznam použitých zkratek

ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintrifosfát
ATR	Ataxia telangiectasia and RAD3 related
BARD1	BRCA1 associated ring domain 1
bp	párů bází (base pare)
<i>BRCA</i>	Breast cancer
BRC	Řada opakování aminokyselin v <i>BRCA2</i> genu
BRCT	BRCA1 C-terminal domain
<i>BRIP1</i>	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
CA 15-3	Nádorový antigen 15-3
<i>CASP-8</i>	Caspase-8
CEA	Karcinoembryonální antigen
CpG	Cytosin-fosfát-Guanin
CT	Počítačová tomografie (computer tomography)
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
DCIS	Duktální karcinom in situ
dCTP	Deoxycytidintrifosfát
ddATP	Dideoxyadenosintrifosfát
ddCTP	Dideoxycytidintrifosfát
ddGTP	Dideoxyguanosintrifosfát
ddNTP	Dideoxynukleotidtrifosfát
ddTTP	Dideoxythymidintrifosfát
dGTP	Deoxyguanosintrifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxynukleotidtrifosfát
dTTP	Deoxythymidintrifosfát
EXO I	Exonukleáza I

F	Forward primer
<i>FANCA</i>	Fanconi anemia, complementation group A
<i>FGFR2</i>	Fibroblast growth factor receptor 2
H	Vodík
HBOC	Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií
<i>CHEK2</i>	Checkpoint kinase 2
kb	Kilobáze
kDa	Kilodalton
LCIS	Lobulární karcinom in situ
<i>LKB1</i>	Liver kinase B1
<i>LSP1</i>	Lymphocyte specific protein 1
<i>MAP3K1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MLPA	Multiplexní amplifikace sondy závislá na ligaci
<i>NBS1</i>	Nijmegen breakage syndrome 1
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace
NGS	Sekvenování další generace (next generation sequencing)
NLS	Jaderný lokalizační signál (nuclear localisation signal)
NTP	Nukleotidtrifosfát
OH	Hydroxylová skupina
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
<i>PALB2</i>	Partner and localizer of BRCA2
PCR	Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PET	Pozitronová emisní tomografie
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog
R	Reverse primer
<i>Rb</i>	Retinoblastomový gen
RING	Really interesting new gene

RNA	Ribonukleová kyselina
rSAP	Shrimp alkaline phosphatase
<i>STK11</i>	Serine/threonine kinase 11
TE	Tris-EDTA pufr
TBE	Tris-borát-EDTA pufr
<i>TGFβ1</i>	Transforming growth factor beta 1
TMN	Tumor, uzlina, metastázy (tumor, node, metastases)
<i>TNRC9</i>	Trinucleotide repeat containing 9
<i>TP53</i>	Tumor protein p53
UV	Ultrafialové (ultraviolet)
VOUS	Varianty s nejasným významem (variants of uncertain significance)